MEDEDEELINGEN
UIT
'S LANDS PLANTENTUIN

XLVI

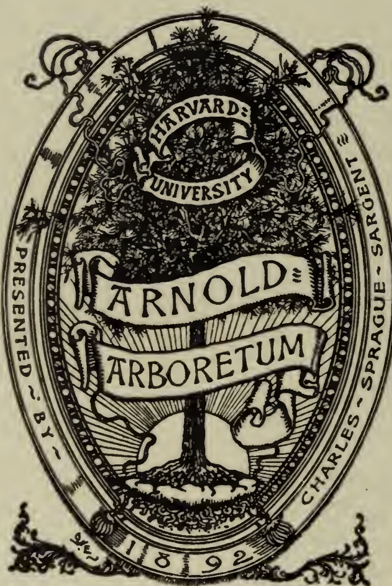
ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE DE BESTANDDEELEN VAN HET THEEBLAD EN DE VERANDERINGEN WELKE DEZE STOFFEN BIJ DE FABRIKATIE ONDERGAAN

DOOR

Dr. A. W. NANNINGA

DEEL I

BATAVIA
G. KOLFF & Co.
1901.


HARVARD
UNIVERSITY
ARNOLD
ARBORETUM
PRESENTED BY
CHARLES SPRAGUE SARGENT
1892

ONDERZOEK BESTANDDEELEN THEEBLAD EN VERANDERING BIJ FABRICATIE

MEDEDEELINGEN

UIT

'S LANDS PLANTENTUIN

XLVI

ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE DE BESTANDDEELEN VAN HET THEEBLAD EN DE VERANDERINGEN WELKE DEZE STOFFEN BIJ DE FABRIKATIE ONDERGAAN

DOOR

Dr. A. W. NANNINGA

DEEL I

BATAVIA
G. KOLFF & Co.
1901.

Typ. G. Kolff & Co. — Batavia.

INHOUD.

INLEIDING.

Van verschillende zijden zijn er op dit gebied reeds onderzoekingen verricht en zullen de voornaamste resultaten daarvan — zooverre deze uit de hier aanwezige litteratuur konden worden nagegaan — aan 't begin van elk hoofdstuk in 't kort worden vermeld, om daardoor meteen een overzicht te verkrijgen van het belangrijkste, dat er tot dusverre op het gebied der theechemie is gepubliceerd.

De samenstellende bestanddeelen van het theeblad kunnen wij met het oog op de theefabrikatie in 2 cathegoriën verdeelen:

1. Stoffen die bij de processen der fabrikatie de eene of andere verandering (chemische omzetting) ondergaan.

2. Bestanddeelen die aan de chemische reacties der fabrikatie geen direct aandeel hebben, en die dus in even groote hoeveelheid als zij in het theeblad voorkomen in de bereide thee worden teruggevonden.

Uit den aard der zaak is voor ons doel de 1e cathegorie de belangrijkste en zal daarom 't uitvoerigste worden behandeld; evenwel is de studie der onder 2 genoemde stoffen ook noodzakelijk, aangezien wij eerst de eigenschappen dezer verbindingen moeten kennen en eene daarop gegronde methode moeten vinden voor hare quantitatieve bepaling, zoowel in het blad als in de bereide thee, om daaruit te kunnen concludeeren, of zij bij de processen der fabrikatie eene actieve rol zal spelen.

Ook al vinden wij een bestanddeel van het blad in even groote hoeveelheid terug in de bereide thee, dan nog kunnen wij daaruit niet met zekerheid afleiden, dat het voor de fabrikatie van geenerlei belang is, aangezien het daarbij ook indirect eene rol kan

vervullen, door bijv. omzettingen van andere bestanddeelen te bewerken of te bevorderen.

Buitendien zijn er onder laatstgenoemde cathegorie stoffen die op den smaak der thee influenceeren (wij noemen hier slechts de caffeïne of theïne) en die dus daardoor alleen reeds een nader onderzoek verlangen.

Om de chemische reacties, welke bij de verschillende processen der theefabrikatie plaats vinden, te kunnen vervolgen en verklaren, moet dus eerst zooveel mogelijk elk chemisch bestanddeel van het blad in zuiveren toestand worden afgescheiden; daarop moeten die verbindingen, welke tot dusverre nog niet of onvoldoende bekend zijn, nader worden bestudeerd, hare voornaamste eigenschappen moeten worden vastgesteld en hare verhouding onderling bij de chemische processen der fabrikatie worden vervolgd, terwijl eindelijk ook de ontstane ontledingsproducten aan een onderzoek dienen te worden onderworpen.

Een paar der belangrijkste bestanddeelen van het theeblad zijn wel de *caffeïne* en het *looizuur*, de caffeïne om hare werking op het menschelijk organisme, en het looizuur zoowel om hare belangrijke rol bij de fabrikatie als om den invloed dien het uitoefent op den smaak der thee.

Deze beide bestanddeelen zijn daarom behandeld in de beide eerste hoofdstukken.

Aangaande de caffeïne konden zich de onderzoekingen beperken tot het vaststellen eener eenvoudige methode voor hare quantitatieve bepaling in verschillende caffeïne-houdende substanties, waarbij alleen de verhouding der caffeïne tot het theelooizuur aan een nader onderzoek werd onderworpen. Als aanhang van dit hoofdstuk vindt men de resultaten der bepaling van caffeïne in andere caffeïne-houdende substanties volgens de nieuw gevonden methode.

Het theelooizuur werd vrij uitvoerig behandeld, doch aangezien de formule dezer krystalliseerende chemische verbinding nog steeds niet met zekerheid is op te stellen, is dit onderzoek nog niet als afgeloopen te beschouwen.

Het 3e hoofdstuk behandelt o. a. het glycosied der theeblaren, eene zeer interessante verbinding, die bij de theefabrikatie eene

belangrijke rol speelt en daarbij nagenoeg geheel wordt ontleed-benevens eenige andere in het waterig theeëxtract zich bevindende verbindingen

Bij het onderzoek van plantenstoffen wordt weliswaar de methode der *gefractionneerde extractie* veel toegepast 1), evenwel werd daarbij tot dusverre naar onze meening niet genoeg aandacht geschonken aan de aanwezigheid van eene kleinere of grootere hoeveelheid water in de te extraheeren substantie, zoodat het niet overbodig scheen de uiterst gewichtige rol welke het water daarbij speelt, in 't licht te stellen zooals speciaal in Hoofdstuk I en II is geschied.

NANNINGA.

Buitenzorg, November 1900.

---

1) Zie o. a. DRAGENDORFFS »Untersuchung der Pflanzenstoffe".

HOOFDSTUK I.

DE QUANTITATIEVE BEPALING VAN CAFFEÏNE.

Voor de bepaling van caffeïne bestaan er een groot aantal methoden, waarvan er o. a. in de dissertatie van VITÉ 1) een 26-tal besproken worden.

Over 't algemeen zijn deze methoden zeer omslachtig en geven vrij sterk uiteenloopende resultaten en dikwijls een min of meer onzuiver product. Volgens 16 verschillende methoden bepaalde VITÉ de caffeïne in een zelfde monster thee en vond resultaten die uiteenliepen van 1.55 tot 2,90%, terwijl het verkregen product in vele gevallen min of meer gekleurd was. De mate van onzuiverheid der verkregen producten — dikwijls verkregen na 1 of meer keeren omkrystalliseeren — werd door bepaling van het stikstofgehalte niet nagegaan.

De beste resultaten geeft volgens de onderzoekingen van VITÉ de gewijzigde methode van HILGER, die hij als volgt omschrijft.

„5 G. theepoeder (gezeefd door een haarzeef met openingen van 4 mM²) worden 3 maal een uur lang telkens met 300 cM³ water geëxtraheerd (gekookt); zonder filtreeren of coleeren worden de vereenigde extracten tot op ¼ ingedampt en dan heet vermengd met versch neergeslagen loodoxyd onder toevoeging van grofkorrelig uitgewasschen zand. Het mengsel wordt op 't waterbad gedroogd en in een SOXLETH's of FLÜCKINGER's extractie-apparaat 3 uur lang met chloroform geëxtraheerd.

De rest die overblijft na afdestilleeren van het chloroform, wordt in heet water opgelost, het filtraat in een gewogen krystal-

1) »Kritische Studien über die Bestimmung des Coffeïns im Thee".

liseerschaal of kolfje op 't waterbad verdampt en de overblijvende rest niet boven 100° ('t best in een water-droogstoof) gedroogd en gewogen".

Ook deze methode is vrij omslachtig, terwijl volgens onze ervaring de chloroformextractie van het droge poeder dikwijls na 3 uren nog lang niet is afgeloopen.

De methode door v. Romburgh en Lohmann hier in 't laboratorium tot dusverre gevolgd is:

„10 G der fijngepoederde thee worden in een extractie-apparaat geëxtraheerd met alkohol waaraan eenige druppels azijnzuur zijn toegevoegd, totdat de vloeistof kleurloos afloopt. De alkohol wordt afgedampt, het residu eenige malen met water opgekookt, in een maatkolf van 100 cM^3 gebracht, 5—6 cM^3 loodazijn toegevoegd, afgekoeld, opgevuld tot 100 cM^3 en gefiltreerd.

50 cM^3 van het filtraat worden met chloroform uitgeschud en in het chloroformextract de caffeïne bepaald door weging na drogen op 105°".

Deze vrij handige en vlugge methode gaf voor zwarte thee goede resultaten overeenkomende met die verkregen naar de veel omslachtiger methode van Vité.

Evenwel werd in groene thee en versch gedroogd blad volgens deze methode steeds minder gevonden dan in de zwarte thee, terwijl ook in 't zelfde monster groene thee of gedroogd blad de methode van Vité meer gaf dan die van v. Romburgh en Lohmann. Eene verklaring voor dit verschijnsel werd niet gevonden; alleen was het duidelijk dat de alkohol-extractie-methode (v. R. en L.) voor groene thee en versch gedroogd blad niet kan worden toegepast.

Van belang scheen het daarom eene methode te vinden, volgens welke de caffeïne zoowel in groene thee als in het gedroogde blad in korten tijd quantitatief kon worden bepaald.

Vooraf echter werd getracht de oorzaak op te sporen van de te kleine waarden welke volgens de alkoholextractie methode werden gevonden.

Om de mogelijkheid uit te sluiten, dat het verschil in caffeïne in direct gedroogd blad en zwarte thee reeds in het blad (vóór de bewerking) aanwezig zou zijn, werd van een partijtje theeblad de helft direct gedroogd, de andere helft kunstmatig gefermenteerd en daarna gedroogd.

Op deze wijze gaven een 2-tal monsters volgens de methode van v. R. en L.:

1[a]	Java-theeblad direct gedroogd:	2,51	°/₀	Caffeïne.
1[b]	't zelfde blad gedroogd na kunstmatige fermentatie (behandeling met chloroform):	3,77	„	„
2[a]	Assam-theeblad direct gedroogd:	2,66	„	„
2[b]	't zelfde blad gedroogd na behandeling met chloroform	3,17	„	„

De geëxtraheerde resten werden alle op caffeïne onderzocht, hetwelk echter uit alle 4 monsters totaal geëxtraheerd bleek.

Vervolgens werden nog eenige monsters gedroogd blad en fabrieksthee, bereid van dezelfde partij blad, onderzocht zoowel volgens de methode der water- (Vité) als der alkohol-extractie (v. R. en L.); de resultaten waren:

		Alkoholextr.	Waterextr.
1[a]	Versch gedroogd blad van Parakan Salak	1,34 °/₀	1,88 °/₀
1[b]	Zwarte thee zelfde partij Parakan Salak	1,98 „	1,96 „
2[a]	Gedroogd blad van Tjiomas	2,10 „	2,47 „
2[b]	Zwarte thee „ „	2,56 „	2,48 „

Ook hier werden de geëxtraheerde resten op caffeïne onderzocht, doch met negatief resultaat.

Uit deze onderzoekingen bleek reeds voldoende, dat bij zwarte thee beide onderzochte methoden ongeveer dezelfde resultaten geven, terwijl het geringer gehalte aan caffeïne vroeger gevonden in gedroogd blad en in groene thee volgens de alkohol-extractie-methode in werkelijkheid niet bestaat, doch te wijten is aan onnauwkeurigheid der methode.

Bleek reeds uit het vorige dat de caffeïne door den alkohol wel degelijk ook uit het gedroogde blad wordt opgelost, zoo bleef ons dus de vraag: bevindt zich het tekort aan caffeïne in het loodneerslag of in 't filtraat daarvan?

Om dit uit te maken werd het alkoholisch extract van 20G. theeblad, na afdestilleeren van den alkohol en opnemen van den rest in water, gebracht op 200 cM^3.

a 100 cM^3 hiervan werden warm behandeld met 5 cM^3 lood. azijn, waarna werd gefiltreerd; 52½ cM^3 filtraat werden uitgeschud met chloroform, en daarop het chloroform afgedampt. De overige 52½ cM^3 (dus met filter en neerslag inkluis) werden met water uitgekookt; daarop werd gefiltreerd, herhaald met water uitgewasschen en in 't filtraat de caffeïne bepaald. In de eerste 52½ cM^3 werd gevonden 0,78G en in de 2e helft 1,34 G. caffeïne. Het neerslag had dus blijkbaar een gedeelte der caffeïne vastgehouden, dat eerst bij uitkoken met veel water werd losgelaten.

b. 100 $c.M^3$ werden direct (zonder neerslaan met lood) gefiltreerd ter verwijdering van een weinig in water onoplosbare bestanddeelen als chlorophyl, hars etc.

50 $c.M^3$ van 't filtraat werden als gewoonlijk uitgeschud met chloroform en het oplosmiddel verdampt, waarbij 0,66 G caffeïne verkregen werd, of wel op het blad berekend 1,32 %.

Ook hier ontbrak dus een gedeelte der caffeïne hetwelk zich kon bevinden òf in 't filtraat waaruit het dan waarschijnlijk na herhaald schudden zou zijn te verwijderen òf in 't geringe neerslag van chlorophyl etc.

Het filtraat werd verder met chloroform uitgeschud en bleek nog vrij veel caffeïne te bevatten. Na 6 keer uitschudden was het nog niet geheel caffeïne-vrij.

Aangezien het alkoholextract en het looizuurneerslag, die beide de caffeïne bleken vast te houden, voor een groot deel bestaan uit looizuur, hetwelk bij de bewerking van het blad tot zwarte thee voor een aanzienlijk deel als zoodanig verdwijnt,

terwijl juist bij zwarte thee geen noemenswaard tekort aan caffeïne werd gevonden, diende nu te worden nagegaan, of wellicht deze verbinding de oorzaak zou zijn van het terughouden der caffeïne.

Bekend was dat alkaloïden, ook caffeïne met tannine verbindingen vormen, welke dikwijls onoplosbaar zijn; het scheen dus zaak om ook de verhouding van het theelooizuur tot caffeïne te onderzoeken.

De bereiding van het theelooizuur geschiedde als volgt:

De gedroogde blaren werden geëxtraheerd met alkohol; het alkoholisch extract ingedampt, opgenomen met water.

Nu werd een weinig loodazijn toegevoegd en gefiltreerd.

Bij 't filtraat werd meer loodazijn gevoegd en 't neerslag weer warm gefiltreerd.

Na uitwassching werd het neerslag gesuspendeerd in heet water en daarna ontleed door zwavelwaterstof.

Na filtratie werd (koud) uitgeschud met chloroform totdat geen caffeïne meer daarin overging en daarop werd met azijnaether het looizuur uitgeschud, hetwelk na afdestilleeren van 't oplosmiddel als een licht roodbruine stroop achterbleef.

Eenige orienteerende proeven gaven nu 't volgende:

Voegt men bij de waterige oplossing van het op deze wijze bereide looizuur eene caffeïne-oplossing, dan ontstaat er een sterk melkachtig neerslag, dat zich na eenig staan in dikvloeibare roodbruine druppels op den bodem afzet.

Het melkachtig neerslag gaat bij toevoeging van veel water en bij verwarming in oplossing.

Lost men het in water op en voegt daarna nog meer looizuur-oplossing toe, dan verschijnt het weer.

Om de storende werking van het theelooizuur bij de caffeïne-bepaling volgens v. Romburgh en Lohmann te onderzoeken, werden nu de volgende quantitatieve proeven genomen:

Proef 1. Circa 1 G. theelooizuur werd in water opgelost en vermengd met eene waterige oplossing waarin 0,25 G. caffeïne; In de koude oplossing ontstaat het neerslag van caffeïne en looizuur, dat in de warmte weer oplost. Er werd nu in de warmte $2^1/_2$ c.M³ loodazijn toegevoegd, waarna de vloeistof werd afgekoeld en op 100 c.M³ gebracht.

Door 50 c.M³ van 't filtraat uit te schudden met chloroform werd 0,090 G. caffeïne teruggewonnen, d. i. *72* °/₀ van de gebruikte hoeveelheid.

Proef 2. 2 G. looizuur werd met 0,25 G. caffeïne in ± 90 c.M³ heet water opgelost; nu werden 5 c.M³ loodazijn toegevoegd en werd na afkoeling en opvullen tot 100 c.M³ gefiltreerd. In 50 c.M³ filtraat werden 0,055 G. caffeïne teruggewonnen, d. i. slechts *44* °/₀.

De hoeveelheden looizuur en caffeïne waren in dit geval ongeveer even groot als bij de bepaling in 10 G. gedroogd blad volgens de methode van v. R. en L. het geval is.

Uit het bovenstaande blijkt o. i. voldoende dat de oorzaak van het tekort aan caffeïne gevonden door toepassing der methode van v. R. en L. ook voor gedroogd blad is te zoeken in de verhouding van het looizuur tot de caffeïne.

Verder blijkt daaruit ook, dat uit eene waterige caffeïne-oplossing, waarin tegelijkertijd looizuur aanwezig is, het volledig uitschudden der caffeïne met chloroform eenig bezwaar oplevert.

Bij het zoeken naar eene betere methode voor de quantitatieve bepaling van caffeïne in versch gedroogd theeblad en groene thee (wat bijna op 't zelfde neerkomt) moest dus getracht worden eene oplossing te verkrijgen waarin al de caffeïne, doch geen looizuur aanwezig was.

Voor de extractie was dus alkohol niet geschikt evenmin als azijnaether of aceton, die beide ook het theelooizuur oplossen.

Geprobeerd werden dus de volgende oplosmiddelen: chloroform, tetrachloorkoolstof, benzine, petroleumaether, aether.

Doch ook hier werd een negatief resultaat verkregen, daar uit het droge poeder de verschillende oplosmiddelen de caffeïne soms in 't geheel niet, soms zeer langzaam en onvolledig extraheerden.

Reeds in het 2e Theeverslag 1) werd er op gewezen, dat de extractie van thee met verschillende oplosmiddelen in tegenwoordigheid van *water* een geheel ander verloop heeft, dan wanneer de thee en 't oplosmiddel volkomen droog zijn. Frappant was dit gebleken o. a. bij de extractie van versche blaren met petroleumaether, dat na eenige uren hieruit al de caffeïne had geëxtraheerd, terwijl uit droge thee bijna geen caffeïne in oplossing ging.

Onderzocht werd nu of een der genoemde oplosmiddelen voor de *quantitatieve* extractie van caffeïne uit theebladpoeder en groene thee geschikt zou zijn in tegenwoordigheid van eene zekere hoeveelheid water.

Benzine en petroleumaether bleken ook nu zeer langzaam te extraheeren, zoodat na 5 uur extractie de rest nog vrij veel caffeïne bevatte.

Tetrachloorkoolstof extraheerde bij aanwezigheid eener voldoende hoeveelheid water vrij goed; na 4—5 uur extractie was het poeder gewoonlijk caffeïne-vrij.

Chloroform extraheerde veel vlugger; zelfs was gewoonlijk na 1 uur extractie de rest reeds caffeïne-vrij.

Het verkregen product bleek behalve caffeïne slechts eene geringe hoeveelheid in water onoplosbare bestanddeelen te bevatten (o. a. chlorophyl en hars) waarvan het gemakkelijk was te zuiveren en in zuiver witten gekrystalliseerden toestand werd verkregen.

---

1) Zie »Tweede verslag over de onderzoekingen betreffende op Java gecultiveerde Theeën".

Volgens deze voorproeven scheen dus het chloroform van de oplosmiddelen het verkieselijkste.

De methode hierop gebaseerd werd verder uitgewerkt en daarop steeds als volgt uitgevoerd.

10 G. bladpoeder (of thee) worden met zooveel water bevochtigd en goed gemengd, dat het watergehalte (met inbegrip van het reeds aanwezige gehalte) 20—25°/₀ bedraagt en dan in een extractie-apparaat met chloroform geëxtraheerd gedurende 2 uren. Gewoonlijk is 1 uur zelfs voldoende.

Na afdestilleeren van het chloroform wordt de rest in hokend water opgenomen.

Nu worden onder omschudden een paar druppels loodazijn toegevoegd.

Na afkoeling wordt tot 100 cM^3 opgevuld, gefiltreerd en 50 cM^3 van het nu nagenoeg kleurlooze filtraat uitgeschud met chloroform.

Na afdestilleeren van het chloroform wordt de op 105° gedroogde caffeïne gewogen.

Het verkregen product is gewoonlijk absoluut wit en fraai gekrystalliseerd.

Eenige quantitatieve proeven ter vergelijking van de nieuwe methode met die van VITÉ en van v. ROMBURGH en LOHMANN gaven de volgende resultaten:

Versch gedroogde theeblaren:

methode met chloroform gaf	2,69	°/₀	caffeïne,
„ van v. R. en L.	1,78	„	„

Theeafval uit de fabriek (dus gefermenteerd)

droog geëxtraheerd met chloroform verkregen	0,76	„	„
na toevoeging van 20 °/₀ water geëxtr. m. chloroform:	2,6	„	„
methode met alhokol	2,32	„	„
„ VITÉ	2,6	„	„

Groen blad direct gedroogd			
droog met chloroform	1,7	°/₀	caffeïne,
na toevoeging van 20 °/₀ water	3,16	„	„
luchtdroog met chloroform 1)	3,0	„	„
methode v. R. en L.	2,0	„	„
„ VITÉ	2,8	„	„
Groene thee			
methode met chloroform bij 20 °/₀ water	2,06	„	„
„ v. R. en L.	1,50 en 1,53	„	„
„ VITÉ	1,78 en 1,48	„	„
Zwarte thee van Parakan Salak.			
methode m. chloroform + 20 °/₀ water	2,5	„	„
„ van v. R. en L.	2,5	„	„
„ VITÉ	2,5	„	„

De verkregen resultaten geven aanleiding tot de volgende conclusies:

1e. De alhokol-extractie methode van v. R. en L. geeft voor direct gedroogd theeblad en groene thee te kleine waarden voor het caffeïne-gehalte.

Dit resultaat was na het voorgaande te verwachten en vindt zijne verklaring in de omstandigheid, dat èn in 't loodneerslag caffeïne wordt teruggehouden, èn in het filtraat dat nog looizuur bevat een gedeelte van de caffeïne door dit looizuur hardnekkig wordt vastgehouden, zoodat bij gewone wijze van uitschudden (3 á 4 keer tekens met ± 20 cM³ chloroform) de vloeistof steeds nog caffeïnehoudend is.

2e. Voor zwarte thee geeft de alhokol-extractiemethode ongeveer even hooge waarden als de water-extractie en de chloroform-extractie

Alleen voor zwarte thee is dus de alhokol-extractie methode,

1) Het fijne poeder had in de zeer vochtige Buitenzorgsche atmosfeer vrij veel water opgenomen.

die ongeveer even snel is uit te voeren als de chloroform-extractiemethode, toe te passen.

3e. De waterextractie methode van Vité schijnt voor groene thee en gedroogd blad eenigszins te geringe waarden te geven, daar in nagenoeg alle onderzochte monsters door de chloroform-extractiemethode een weinig meer (en steeds zuiver wit) product werd verkregen. Èn om deze reden èn wegens hare omslachtigheid is voor genoemde caffeïnehoudende substanties de methode van Vité niet aan te bevelen en dient zij te worden vervangen door de extractie met chloroform zooals boven omschreven.

4e. Voor zwarte thee heeft de methode van Vité geen enkel voordeel boven die met chloroform, wel daarentegen het nadeel van hare omslachtigheid (wat steeds gepaard gaat aan meerdere bronnen van fouten en dus geringere nauwkeurigheid), zoodat ook hier te prefereeren is òf de methode van v. R. en L. voor alhokol-extractie òf die der chloroformextractie in tegenwoordigheid van water.

Eenige opmerkingen omtrent de in Vité 's onderzoek genoemde methoden mogen hier niet achterwege blijven. Volgens bijna al die methoden wordt het theepoeder herhaald uitgetrokken met kokend water, zeer verdund zwavelzuur of zeer verdunde sodaoplossing.

De verkregen extracten worden ingedampt onder toevoeging van gebrande magnesia, kalk of loodoxyde en soms van zand of glaspoeder.

Daarop wordt het verkregen residu na fijnmalen in drogen toestand geëxtraheerd met chloroform, aether of benzol.

Behalve dat al deze methoden zeer omslachtig zijn, lijden zij volgens 't voorgaande aan het euvel, dat de extractie van het *droge* poeder dikwijls zeer lang duurt en menig keer zelfs dan nog onvolkomen is.

De methode van Legrip en Petit, ook aldaar genoemd (pag. 8) vertoont oogenschijnlijk veel overeenkomst met de door ons gevolgde chloroform-extractie methode:

„De thee wordt (hierbij) tot een grof poeder gestooten, vermengd

met 2 deelen heet water (op 1 deel thee) en nu de vochtige massa in een „passende apparaat" met chloroform geëxtraheerd.

Het verkregen product, dat met eene olieachtige substantie verontreinigd is, wordt door 1 keer omkrystalliseeren uit heet water onder toevoeging van beenderenkool in witten toestand verkregen".

De groote hoeveelheid water, die bij deze methode wordt toegevoegd doet het theepoeder en nog meer het poeder van gedroogd blad aanzienlijk opzwellen tot eene samenhangende min of meer weeke massa, waarin zooals uit proeven bleek het chloroform vrij moeilijk doordringt en daarom ook moeilijk de caffeïne totaal extraheert. Het looizuur is hierin zeker voor een groot deel in opgelosten toestand aanwezig en houdt in dezen toestand de caffeïne — zooals wij vroeger gezien hebben — hardnekkig vast.

Inderdaad biedt dus deze methode niet de voordeelen voor snelle totale extractie als de boven door ons beschrevene.

De verder nog door Vité besproken methoden waaronder bijv. directe extractie van het *droge* theepoeder met aether, chloroform, of met alkohol meen ik na de voorgaande beschouwingen met stilzwijgen te kunnen voorbijgaan.

AANHANG.

Nadat voor de quantitatieve bepaling van caffeïne in de verschillende soorten thee en in versch gedroogd theeblad eene geschikte methode was gevonden, scheen het van eenig belang na te gaan of deze methode ook voor andere caffeïne-houdende substanties zou zijn toe te passen.

Het onderzoek werd uitgevoerd met:

1. *a* gebrande en *b* ongebrande koffieboonen,
2. gedroogde koffieblaren,
3. kolanoten.

a. Gebrande koffie.

Het monster werd in drogen toestand goed fijngemalen en gezeefd door zeef B 30.

10 G. werden in een Soxleth's toestel geëxtraheerd met alkohol van 90°/₀. Na 2 uur liep de alkohol vrij wel kleurloos door en werd de extractie als geëindigd beschouwd.

De uitgeloogde rest bleek bij onderzoek geheel caffeïne-vrij te zijn. Het zwartbruin gekleurde extract werd ingedampt; er bleef een nagenoeg zwarte zeer aanzienlijke rest.

Na eenige keéren opkoken met water en overbrengen in een kolfje van 100 c.M^3 werd 5 c.M^3 basisch lood toegevoegd en na afkoeling opgevuld tot 100 cM^3 en gefiltreerd.

Het filtraat was nog vrij bruin gekleurd.

50 c.M^3 werden eenige keeren uitgeschud met chloroform, dat hierbij eene gele kleur aannam en dus benevens de caffeïne een gedeelte van de bruingekleurde verbindingen in zich opnam.

Het verkregen product was donkerbruin gekleurd en dus waarschijnlijk zeer onzuiver. Gedroogd woog het 0,202 G.

Het werd nu in water opgelost en eenige keeren opgekookt met beenderenkool; de oplossing was op deze wijze echter niet geheel kleurloos te verkrijgen; het product na indamping der waterige oplossing verkregen bleef dan ook steeds eene lichtbruine kleur behouden.

Om eene juiste maatstaf te verkrijgen voor de zuiverheid van het verkregen product werd dit zoowel hier, als ook in alle volgende caffeïne-bepalingen steeds op zijn stikstofgehalte onderzocht, waaruit de aanwezige hoeveelheid zuivere caffeïne (zonder krystalwater, met 28,9 °/₀ stikstof) werd berekend.

Het gezuiverde nog eenigszins gekleurde product uit de gebrande koffie woog 0,084 G. en bevatte 0,0133 G. stikstof overeenkomende met 0,92 °/₀ zuivere caffeïne.

10 G. van het fijne poeder van gebrande koffie werd nu na vermenging met 1,5 c.M^3 water in een oxleth's apparaat geëxtraheerd met chloroform zooals op pag. 8 aangegeven.

Het extract was hier eveneens bruin gekleurd, gaf evenwel na afdamping van het chloroform een vrij geringe doch ook bruin gekleurde rest.

De waterige oplossing hieruit verkregen vertoonde slechts een lichtgele kleur, waarvan ook hier een weinig in 't chloroform overging, zoodat het op deze wijze verkregen product ook lichtbruin gekleurd was.

Door koken met beenderenkool werd hier een product verkregen, dat fraai gekrystalliseerd was en nog slechts een geringe gele tint vertoonde.

Voor het koken met beenderenkool woog het product 0,148 G., na het opkoken nog 0,140 G.,

terwijl daarin gevonden werden 0,0364 G. stikstof overeen. komende met 0,126 G. = 1,26 °/₀ zuivere caffeïne.

De methode van Vité op 't zelfde monster toegepast bleek hier nog lastiger te zijn dan bij thee, door het opzwellen en moeilijk zich afzetten der fijngemalen koffie en door de groote massa stoffen die hierbij in oplossing gaan.

Voor de gebrande koffie werd ook hier een bruin gekleurd product verkregen, dat na herhaalde zuivering vrij sterk gekleurd bleef.

In 5 G. werd gevonden 0,058 G. = 1,16 °/₀ gezuiverde caffeïne, waarin 0,0147 G. stikstof waren, overeenkomende met 1,02 °/₀ *zuivere* caffeïne.

Aangezien de verdere extracties (van koffie, koffiebladeren en kola) geen bezwaar opleverden, geven wij hier slechts de resultaten:

GEËXTRAHEERDE STOFFEN.	Alkohol-extractie. Verkregen hoeveelheid caffeïne (gezuiverd) uitgedrukt in %.	Alkohol-extractie. Daarin stikstof uitgedrukt in % van het uitgangsmateriaal.	Alkohol-extractie. Uit stikstofgehalte berekende hoeveelheid zuivere caffeïne in %.	Chloroform-extractie. Caffeïne in % als kolom 1.	Chloroform-extractie. Stikstof daarin als kolom 2.	Chloroform-extractie. Uit stikstofgehalte ber. caffeïne in % als kolom 3.
1. Liberia-koffie.						
a. gebrand.	1,88	0,295	1,02	1,64	0,428	1,48
b. ongebrand.	1,32	0,302	1,04	1.44	0,393	1,36
2. Java koffie.						
a. gebrand	1,90	0,347	1,20	1,68	0,439	1,56
b. ongebrand.	1,54	0.380	1,32	1,56	0,435	1,55
3. Ander monster Java-koffie.						
a. gebrand.	1,64	0,266	0,92	1,40	0,363	1,26
b. ongebrand.	1,25	0,295	1,02	1,23	0,347	1,20
4. Gedroogde koffieblaren (groen)	0,68	0,139	0,48	0,67	0,192	0,66
5. Kolanoot.						
1e monster.	1,26	0,347	1,20	1,60	0,472	1,64
2e monster.	1,60	0,448	1,59	2,04	0,607	2,10
3e monster ('t zelfde als het 2e maar boven kalk gedr.) . .	1,52	0,432	1,54	1,98	0,593	2,05

Alleen zij hier nog de opmerking gemaakt, dat voor de bepaling van caffeïne in kola zoowel als in koffie het poeder vooral goed fijn moet zijn, wat bij onderzoek van thee- en koffieblaren niet zoo noodzakelijk is.

Het geëxtraheerde poeder werd telkens op caffeïne onderzocht en werd de extractie verworpen wanneer daarin meer dan sporen caffeïne konden worden aangetoond.

Het aanzienlijk tekort gevonden bij kola volgens de alkohol-extractie-methode is zeker in hoofdzaak te wijten aan de groote hoeveelheid looizuur die zij bevat en die bij alkohol-extractie mee in oplossing gaat.

Opvallend is het verschijnsel, dat de bij chloroform-extractie uit *kola* verkregen caffeïne (die volkomen wit was) een weinig meer dan de theoretische hoeveelheid stikstof bevatte, hetgeen hoogstwaarschijnlijk zal te wijten zijn een aan weinig *theobromine* (dimethylxanthine) dat volgens zijne chemische samenstelling een weinig meer stikstof bevat dan de caffeïne (trimethylxanthine).

Er werd nog een onderzoek ingesteld om de zoogenaamde „*kolanine*" een glycosidische verbinding van caffeïne met suiker in de kola te bepalen.

Daartoe werd de boven kalk gedroogde kola eerst geëxtraheerd met chloroform op de gewone wijze; daarop werd het geëxtraheerde poeder gemengd met kalk en water; het mengsel tot nagenoeg droog op 't waterbad verwarmd onder omroeren en het aldus verkregen poeder opnieuw geëxtraheerd met chloroform. Het resultaat was echter negatief, er werd geen caffeïne meer gevonden.

Bij een volgende proef werd het met chloroform geëxtraheerde poeder eenigen tijd gekookt met verdund zwavelzuur. Het filtraat op caffeïne onderzocht gaf eveneens negatief resultaat.

Wij meenen naar aanleiding van dit onderzoek voorloopig te moeten aannemen, dat in het onderzochte monster kola geen of ten minste niet meer dan een spoor „kolanine" is aanwezig geweest.

Vergelijken wij de verschillende resultaten verkregen met de alhokol- en de chloroform-extractiemethode, zooals zij in bovenstaande tabel zijn weergegeven, dan blijkt ons dat de laatstgenoemde methode nagenoeg steeds hoogere resultaten heeft

gegeven dan de eerste, terwijl het verkregen product bij laatstgenoemde methode steeds zuiverder is geweest dan bij de eerste, hetgeen ook telkens op het oog te zien was.

Bovendien was het verkregen product van de chloroform-methode in bijna alle gevallen nagenoeg chemisch zuiver te oordeelen naar het stikstofgehalte, zoodat wij geen fout van beteekenis zullen maken door het verkregen product te beschouwen als zuivere caffeïne.

Alleen de gebrande koffie maakt hierop misschien een uitzondering en zouden wij willen aanbevelen om bij de bepaling van caffeïne daarin steeds ter contrôle eene stikstofbepaling te maken in het verkregen product.

HOOFDSTUK II.

THEELOOIZUUR.

A. Vroegere onderzoekingen.

Over het in de theeblaren aanwezige looizuur zijn reeds vele onderzoekingen verricht; wij noemen hier die van Mulder, Rochleder, Hlasiwetz, Peligot, Bamber en Tretzel. Al deze onderzoekingen hier te beschrijven zou te ver voeren en meenen wij te kunnen volstaan met de mededeeling der resultaten daarbij verkregen door de beide laatstgenoemde onderzoekers, welke het laatst en ook het uitvoerigst over dit onderwerp onderzoekingen deden.

Bamber, de scheikundige van de „Indian Tea Associaton" bereidde het theelooizuur op de volgende wijze: 1)

Het theeblad wordt met water geëxtraheerd; het extract met loodsuiker gepräcipiteerd en het uitgewasschen neerslag ontleed met zwavelwaterstof.

Na filtratie wordt de oplossing bij lage temperatuur ingedampt en verder gedroogd in eene luchtverdunde ruimte boven zwavelzuur (in een exciccator).

Het verkregen product dat volgens B. uit nagenoeg zuiver looizuur bestond, had o.a. de volgende eigenschappen:

„Het was onoplosbaar in aether en petroleumaether, weinig oplosbaar in absoluten alkohol, gemakkelijk in verdunden alkohol en in koud water.

Als verdere eigenschappen geeft B. de gewone looizuur-reacties

1) Zie »Chemistry and Agriculture of Tea" p. 155.

op en verklaart, dat het een glycosied is, aangezien het zich volgens dezen onderzoeker onder omstandigheden splitst in galluszuur en suiker.

Ook zegt B. verder op pag. 154 van zijn genoemd werk:

„In the case of tea the tannin has usually been described as being similar to gallotannic acid, but it is probable another variety exists in conjunction with it".

Toch geeft B. voor het theelooizuur de formule $C_{27} H_{22} V_{17}$ op, welke dus zal slaan op het looizuur dat volgens B. behalve het galnotenlooizuur nog in het theeblad voorkomt.

Voor de quantitatieve bepaling kan men volgens B. de methode van Löwenthal (titreeren met chameleon etc.) toepassen of naar Hooper het looizuur uit de waterige oplossing neerslaan met lood- of koperacetaat.

De oplossingen worden ook hierbij verkregen door uitkoken der thee met water en opvullen der oplossing tot een bekend volume.

Het *loodzout* op deze wijze verkregen bevatte doorgaans 50°/$_0$ loodoxyde, doch B. vond bij Assam-thee slechts 46—47°/$_0$, verschillende naar de concentratie en de aciditeit der oplossing.

Het *koperzout* op analoge wijze bereid is volgens B. zuiverder en bevat 38 — 38,5°/$_0$ koperoxyde.

Tretzel verkreeg het theelooizuur op de volgende wijze:

De thee wordt met water uitgekookt, het extract op 't waterbad wat ingedampt en daarna (in de kou) uitgeschud met azijnaether waaraan zooveel aether is toegevoegd, dat het aethermengsel zich goed afscheidt.

De azijnaetherische oplossing wordt nu afgedestilleerd en de overblijvende rest gezuiverd door opnemen in koud water, filtreeren (hierbij blijft nog een weinig chlorophyl op 't filter) en indampen.

Na droging verkrijgt men nu het looizuur in den vorm van eene bruine massa die gemakkelijk te pulveriseeren is.

Het verkregen product is oplosbaar in water, alkohol en aceton; minder in aether en onoplosbaar in chloroform.

Verder slaat het lijmoplossing neer en geeft met $Fe\ Cl_3$, een diepblauwe kleur.

Een 2-tal elementair-analyses van het aldus verkregen product gaven:

I. 52,77 % C en 3,72 % H.
II. 52,02 „ „ 4,17 „ „

Volgens berekening bevat digalluszuur-anhydried 52,17 % C. en 3,1 % H.

Uit deze analysen en uit het feit, dat het theelooizuur volgens onderzoek van Tretzel galluszuur afsplitst bij koken met verdund zwavelzuur, meent deze onderzoeker te moeten afleiden dat het theelooizuur is op te vatten als digalluszuur-anhydried.

Eene *acetyl-verbinding* werd als gele massa verkregen door 6—5 uur koken met azijnzuur-anhydried en uitgieten van het product in water.

Na uitwassching met water en drogen werden twee elementair-analyses uitgevoerd en het acetylgehalte bepaald door verzeeping met sterke kali en destillatie van het azijnzuur uit phosphorzure oplossing.

De gevonden waarden kwamen overeen met die van eene pentacetylverbinding van digalluszunr.

Bij koken met zwavelzuur werd geen suiker verkregen, maar wel galluszuur en zoogenaamd phlobapheen, waaruit T. besluit, dat het theelooizuur *geen* glycosied is.

Galluszuur werd hierbij aangetoond op de volgende wijze: door uitschudden van het met zwavelzuur gekookte product met aether en afdampen van den aether werd een roodbruine rest verkregen, die zilverzouten reduceerde en waaruit door sublimatie pyrogalluszuur werd verkregen.

Uit het bovenstaande blijkt reeds voldoende het verschil in eigenschappen van het theelooizuur bereid door verschillende onderzoekers volgens verschillende methoden. Zoo mogelijk loopen

de opgaven der oudere litteratuur nog sterker uiteen; wij meenen daaruit te mogen besluiten, dat het aan genoemde onderzoekers niet gelukt is het theelooizuur in zuiveren toestand te verkrijgen, hetgeen in 't volgende nog nader zal blijken.

B. Bereiding van het zuivere gekrystalliseerde Theelooizuur.

Wanneer men het fijne poeder van gedroogde jonge theeblaren — zooals die voor de theefabrikatie worden geplukt — met water kookt, dan gaat in 't extract o. a. theelooizuur over. Kookt men herhaaldelijk uit met veel water, dan gelukt het nagenoeg al het looizuur in oplossing te brengen.

Tegelijk met het looizuur zijn echter een aantal andere stoffen mee in oplossing gegaan, want terwijl het bladpoeder volgens vele onderzoekingen niet meer dan 25 °/₀ looizuur bevat, bedraagt het waterig extract 50—60 °/₀ van het gewicht van het droge theeblad.

Uit deze zeer onzuivere oplossing het looizuur in zuiveren toestand te verkrijgen is zeer moeilijk.

Slaat men bijv. neer met loodoplossing, dan vindt men in 't neerslag niet alleen het *tannaat* maar nog vele andere in water onoplosbare loodzouten, waaronder wij noemen het *oxalaat*, *pectaat*.

Maar niet alleen deze loodzouten vinden wij in het neerslag, in hoofdstuk 1 (pag.) zagen wij dat bijv. ook *caffeïne* niettegenstaande dat zij met lood geen verbinding vormt en in water gemakkelijk oplosbaar is, toch voor een deel in 't loodneerslag is terug te vinden.

Wordt het loodneerslag, na uitwassching met water ontleed door zwavelwaterstof, dan neemt het gevormde zwavellood wel een deel der onzuiverheden op, maar het grootste gedeelte gaat toch weer mee in oplossing, speciaal de genoemde stoffen.

Zuivering op deze wijze brengt ons dus niet tot het doel en moet een andere weg worden ingeslagen.

Het lag voor de hand hierbij te denken aan een ander oplosmiddel waarin die verbindingen welke met lood worden neergeslagen niet oplossen.

Neemt men ter extractie van het looizuur alkohol in plaats van water, dan gaan o. a. oxaalzuur en pectinezuur (beide voorkomende als kalizouten waarover straks nader) niet mee in oplossing, evenwel is ook nu het looizuurhoudende extract nog verre van zuiver, want volgens vele quantitatieve onderzoekingen bedraagt het alkohol-extract gewoonlijk circa 40—50 % van het uitgangsmateriaal.

Ook nu dus bestaat het extract nog slechts voor ongeveer de helft uit looizuur en is het verontreinigd met een groot aantal vreemde substanties.

Dampt men den alkohol af en neemt men den rest op met water, dan blijft weliswaar een gedeelte der vreemde bestanddeelen onopgelost, doch deze onoplosbare rest is hoogstens 5—8 %, zoodat de verkregen waterige oplossing nog alles behalve zuiver is.

Ook nu blijft het moeilijk het looizuur in zuiveren toestand uit de oplossing te verkrijgen, in de eerste plaats is dit te wijten aan de merkwaardige eigenschap van het looizuur om zich in oplossing met de meest verschillende stoffen te vereenigen (het zij dan chemisch of mechanisch), deze stoffen zelfs ook wanneer zij voor zich alleen in water onoplosbaar zijn hardnekkig vast te houden, zoodat zij steeds het looizuur blijven vergezellen, ook al slaat men dit neer of al schudt men het uit met een of ander oplosmiddel.

Wij hebben dit verschijnsel waargenomen bij de caffeïne, nog frappanter is het bij de quercitrine-achtige verbinding 1) en o. a. bij het hars, stoffen beide in water onoplosbaar.

Om in de te verkrijgen waterige looizuuroplossing zoo mogelijk nog minder vreemde bestanddeelen te verkrijgen, dan bij extractie met alkohol, werd gezocht naar een ander oplosmiddel.

Aangezien looistoffen in 't algemeen goed oplossen in azijnaether en in aceton, werden hiermee proeven genomen, echter in 't eerst met volkomen negatief resultaat: in deze middelen loste van het droge bladpoeder zoo goed als niets op.

---

1) Zie later.

Analoog aan de in hoofdstuk I beschreven nieuwe methode ter bepaling van caffeïne werd nu ook hier de invloed nagegaan welke de tegenwoordigheid van water op de extractie van het looizuur heeft.

Het resultaat was boven verwachting.

Aceton bracht nu in korten tijd nagenoeg al het looizuur in oplossing en ook azijnaether bleek voor het doel geschikt.

Werd de extractie met aceton of azijnaether uitgevoerd in een Soxleth's extractor, nadat te voren het fijne bladpoeder met circa 15 % water was gemengd, dan bleek na eenige uren extraheeren geen looizuur meer in oplossing te gaan.

Werd nu de overblijvende rest met water opgekookt, dan gaf dit waterig extract met lijmoplosing geen neerslag meer; aangezien nu eene zeer sterk verdunde oplossing van looizuur met lijmoplossing nog een neerslag of eene duidelijke opaliseering geeft, meenden wij uit het voorgaande te kunnen afleiden, dat het theelooizuur op de bovenomschreven wijze zoo goed als totaal was geextraheerd.

De vraag was nu hoeveel vreemde bestanddeelen er door de extractie met aceton of azijnzuur behalve het looizuur in oplossing gaan.

Eenige quantitatieve bepalingen gaven voor het aceton- en het azijnaether-extract nagenoeg dezelfde waarden, nl. 30—35 % berekend op het bij 105° gedroogde blad.

Laat men nu deze wijze van extractie voorafgaan door de extractie met chloroform dan gaan er van de 30—35 % totaalextract nog 6—8 % af voor het chloroform-extract, zoodat alleen door aceton of azijnaether worden geëxtraheerd circa 25—30 %.

Voor onzuiverheden in de te verkrijgen waterige oplossing blijven nu dus circa 5% van het bladpoeder-gewicht.

Deze 5% bestaan volgens een verder onderzoek in hoofd-

hoofdzaak uit eene quercitrine-achtige stof benevens een weinig hars en bruine ontledingsproducten van het looizuur welke laatste de oplossing lichtbruin kleuren.

Bij uitschudding der waterige oplossing bleken deze verontreinigingen in de eerste fracties over te gaan, zoodat deze verworpen werden.

De bereiding van het zuivere theelooizuur geschiedde nu op de volgende wijze.

Het fijne poeder der versch gedroogde theeblaren wordt gemengd met zooveel water totdat het mengsel circa 20°/₀ bevat. Nu wordt het poeder — dat nog geheel los en schijnbaar droog is — in een SOXLETH's extractor gebracht en met chloroform geëxtraheerd totdat het extract kleurloos afloopt, wat na 1 à 2 uur het geval is.

Het poeder wordt nu uit den extractor genomen, en in dunne laag aan de lucht uitgespreid, het best op een stuk schoon papier.

Men laat het poeder zoolang liggen, totdat het niet of slechts zeer weinig meer ruikt naar chloroform; daarop wordt het in den extractor teruggebracht en geëxtraheerd met drogen zuurvrijen azijnaether.

De kolf wordt daarbij evenals bij de chloroform-extractie in een waterbad geplaatst, en niet op de vrije vlam verhit, aangezien hierdoor ontleding van het extract (looizuur) onder bruinkleuring kan plaats hebben. Na een paar uren is nagenoeg al het looizuur in 't extract overgegaan, dat daardoor geel gekleurd is met groenen tint van eene kleine hoeveelheid chlorophyl die door het chloroform niet in oplossing is gegaan.

De azijnaether wordt afgedampt, de rest opgenomen in koud water en eerst nog eens uitgeschud (in een scheitrechter) met chloroform om een rest van chlorophyl, een weinig hars etc. te verwijderen.

Nu wordt herhaaldelijk uitgeschud met azijnzuurvrijen azijnaether, waarbij de eerste fracties eenigszins bruin gekleurd zijn

door aanwezigheid eener geringe hoeveelheid bruine ontledingsproducten die niet te vermijden is.

Deze fracties die behalve veel looizuur ook het quercitrine en de rest van hars en wellicht eene geringe hoeveelheid andere onzuiverheden bevatten, worden verworpen, totdat in eene fractie geen quercitrine meer is aan te toonen.

De verdere fracties zijn lichtgeel gekleurd en leveren weliswaar vrij weinig maar nu nagenoeg geheel zuiver looizuur.

Het beste bewijs, dat het aldus verkregen product als *chemisch zuiver theelooizuur* is te beschouwen, levert wel de omstandigheid, dat het na verdamping van den azijnaether na eenig staan bij gewone temperatuur in eene *krystalmassa* overgaat, die al de eigenschappen van het looizuur vertoont en geheel aschvrij is.

De verkregen krystalmassa bestaat uit sferokrystallen, die soms tot 1 cM. en langer uitgroeien.

Lost men het verkregen product in een weinig drogen azijnaether op, en giet de oplossing onder omzwenken in chloroform, dan slaat het looizuur in witte vlokken uit het chloroform neer.

Wordt het neerslag na eenig staan snel op een droog filter gebracht, waarbij men zorgt, dat het niet chloroformvrij met de lucht in aanraking komt, en daarop na sluiting van het filter de hoofdmassa van het chloroform uit het neerslag verwijderd tusschen filtreerpapier, de rest in een exciccator in 't luchtledige, dan verkrijgt men het looizuur in den vorm van een wit poeder.

Voor het verder onderzoek werd steeds (waar niet het tegendeel is aangegeven) het op deze wijze bereide poedervormige product gebruikt, en niet het gekrystalliseerde, aangezien het eerste daarbij veel handiger is.

C. Eigenschappen van het Theelooizuur.

Het *poedervormige theelooizuur* is sterk hygroscopisch zoodat het aan de lucht liggend in een oogwenk is veranderd in eene geelbruine stroopige massa.

Oxydatie heeft hierbij zoo goed als niet plaats, want lost men de stroopige massa op in vrij veel drogen azijnaether, destilleert den azijnaether tot op eene kleine rest af en giet nu de geconcentreerde oplossing in droog chloroform dan verkrijgt men het theelooizuur als nagenoeg wit poeder terug.

Oplosbaarheid.

Het poeder is onoplosbaar in chloroform, benzine en petroleumaether.

In watervrijen aether is het vrij weinig oplosbaar, gemakkelijker in waterhoudenden aether.

In alkohol, aceton en azijnaether lost het gemakkelijk op, ook als deze oplosmiddelen volkomen droog zijn.

Eveneens lost het gemakkelijk op in water en in ijsazijn, dus ook in verdunden alhohol en verdund azijnzuur.

In warm water lost het nog veel spoediger op dan in koud.

In azijnzuuranhydried lost het gemakkelijk op, vooral bij eenige verwarming.

Bij koken met azijnzuuranhydried ontstaat een acetylderivaat (zie later).

De waterige oplossing van het theelooizuur is lichtgeel gekleurd en vertoont de volgende eigenschappen:

De *smaak* is sterk adstringeerend doch *niet bitter*.

Door *alkali* wordt de oplossing direct bruin gekleurd onder oxydatie. Vooral bij eenig schudden is de oplossing spoedig zoo goed als zwart.

Kalk en *Baryt* geven voor een oogenblik een wit neerslag; deze kleur slaat echter direct om eerst in groen, daarna in blauw, om eindelijk tot bruin over te gaan.

Ook deze kleursverandering is te danken aan snelle oxydatie in alkalische oplossing.

Bij de toevoeging van de kalk of het baryt ziet men niet alleen het neerslag zich kleuren, doch ook de oplossing is gekleurd, hetgeen bewijst dat de eerst ontstane onvolkomen geöxydeerde tannaten gedeeltelijk oplosbaar zijn.

Is eenmaal de kleur geheel in bruin overgegaan, hetgeen wordt bespoedigd door schudden (ruime toetreding van de zuurstof der lucht), dan is de oplossing volkomen helder en looizuurvrij. De bruine oxydatieproducten zijn dus in water onoplosbaar.

Kopersulfaat geeft een blauw neerslag, dat in de warmte gevormd vrij goed te filtreeren is, evenwel ziet men hier ook zeer spoedig de kleur van het neerslag veranderen en langzamerhand in *bruin* overgaan.

Reeds onder het uitwasschen is dit niet te vermijden, zoodat het koperzout voor de quantitatieve bepaling van het theelooizuur geen aanbeveling verdient.

Koperacetaat geeft nagenoeg hetzelfde.

Loodacetaat geeft een wit of dikwijls eenigszins lichtgrijs gekleurd neerslag dat in de warmte goed te filtreeren is.

Ook dit neerslag gaat aan de lucht vrij spoedig over in een oxydatieproduct, waarbij de kleur langzamerhand verandert in bruin.

Ook dit zout schijnt daarom voor de quantitatieve bepaling van het looizuur minder geschikt.

Voor de quantitatieve bepaling van het theelooizuur door middel van het koper-of loodzout moet bovendien de waterige looizuuroplossing geen vreemde bestanddeelen bevatten aangezien deze steeds voor een kleiner of grooter gedeelte mee neerslaan.

In geen geval kan men hiervoor bijv. het waterig extract der thee of theeblaren nemen zooals somtijds is geschied (methode Bamber, zie boven) aangezien dit minstens evenveel vreemde substanties bevat als looizuur.

Ferrichloried geeft een diep blauw volledig neerslag. Bij overmaat van dit reagens is het neerslag groenachtig, wat zich eenvoudig laat verklaren uit de omstandigheid dat door samenvoeging van blauw en geel ($Fe\ Cl_3$ in verd. oplossing is geel) steeds groen ontstaat.

In zoutzuur en in azijnzuur zijn al de genoemde neerslagen oplosbaar.

Kaliumpermanganaat (chameleon) geeft in de zwavelzure oplossing, in niet te groote hoeveelheid toegezet een geel neerslag onder sterke gas-(CO_2) ontwikkeling.

Bij toevoeging van meer chameleon wordt het neerslag steeds donkerder onder gasontwikkelling.

Deze reactie werd verder vervolgd (zie later).

Kaliumbichromaat geeft een roodbruin neerslag.

Broomwater geeft een geel neerslag dat in vlokken te voorschijn komt en bij eenig koken gemakkelijk op den bodem zinkt.

Bij eenig staan gaat de broomverbinding in ontleding over, en scheidt weer broom af.

Lijmoplossing geeft met het theelooizuur een wit neerslag dat bij overmaat van lijm zich na eenig schudden als eene elastische lichtgeel gekleurde massa op den bodem afzet, terwijl de oplossing geheel helder is.

Is er overmaat van looizuur in de oplossing aanwezig, dan blijft deze troebel ook na herhaald schudden.

Door *dierlijke huid* wordt het theelooizuur opgenomen.

Eene belangrijke eigenschap van het theelooizuur werd nog gevonden in zijne *optische actieviteit.*

De waterige oplossing van het theelooizuur draait het trillingsvlak der gepolariseerde lichtstralen naar links. Ook deze eigenschap werd nader vervolgd.

D. De soortelijke draaiïng van het Theelooizuur.

Eene kleine inleiding moge hier eene plaats vinden.

Het gezuiverde *eikenlooizuur* (tannine) zooals het in den handel voorkomt, in den vorm van een nagenoeg wit en *schijnbaar* gekrystalliseerd poeder, draait in waterige oplossing het polarisatievlak naar rechts.

Volgens onderzoek van Walden 1) en een vroeger onderzoek van Schiff is de soortelijke draaiïng van de handelstannine echter

1) Berl. Ber. 1897. p. 3153.

niet constant en varieert deze naar de afkomst van het praeparaat. Zoo vond W. bijv. dat een praeparaat van MERCK + 15° een van SCHUCHARD + 67,5° draaide. WALDEN gelukte het zelfs om een gegeven handelstannine door verschillende middelen (dialyse, gefractionneerd neerslaan en uitschudden) in fracties te verdeelen met verschillende soortelijke draaiïng, welke uiteenliep van 21 tot 75°.

De conclusie die WALDEN terecht hieruit meent te moeten trekken is, dat de handelstannine geen chemische verbinding is maar een mengsel.

Voor het theelooizuur scheen nu van belang te onderzoeken 1e of het theelooizuur eene constante draaiïng vertoont;

2e zoo ja, hoe sterk is dan deze soortelijke draaiïng?

Voor de bepaling der draaiïng werd een polarimeter van LAURENT gebruikt met eene buis van 20 cM. lengte.

De polarisaties werden uitgevoerd bij kamertemperatuur, nl. gewoonlijk circa 25° C.

Eenigszins sterk gekleurde oplossingen werden steeds verworpen, aangezien ontkleuren eener looizuuroplossing, op welke manier ook, bleek steeds gepaard te gaan aan een meer of minder aanzienlijk verlies van looizuur, hetgeen door proeven met heldere oplossingen (behandeld als bij de ontkleuring) werd bewezen.

Ter vergelijking werd eene 4-percentige oplossing van zuivere dextrose gepolariseerd, welke bij 25° eene draaiïng aanwees van 4,0° (na opheffing der birotatie door toevoeging van een weinig ammoniak).

a. Hoe sterk draait het theelooizuur?

Hieromtrent werden reeds eenige onderzoekingen verricht vóór dat het ons gelukt was het zuivere theelooizuur af te scheiden, welke hier vermeld worden, omdat de resultaten daarvan nagenoeg overeenkomen met de later gevondene.

De hoeveelheid theelooizuur werd hier bepaald met behulp

van huidpoeder, waarbij de draaiïng der oplossing vóor en na de inwerking van het huidpoeder werd bepaald. Het bleek n.l. dat het looizuur gewoonlijk niet geheel door het huidpoeder werd opgenomen.

De waterige looizuuroplossing werd hier bereid uit het alkoholextract, na verwijdering van caffeïne etc. door extractie met chloroform, vandaar dat een vrij aanzienlijk gedeelte der opgeloste stoffen niet door de dierlijke huid werd opgenomen.

Proef. 1. Er werd eene looizuuroplossing bereid die — 1,50° draaide.

α. 100 c.M.³ dezer oplossing werden in eene platinaschaal ingedampt en vervolgens in een droogstoof op circa 105° tot constant gewicht gedroogd, gewogen, daarop verascht en weer gewogen.

Gewicht aschvrije rest = 0,562 G. (gew. asch = 0,003 G.)

β. 125 c.M.³ der oplossing werden met 3 G. huidpoeder behandeld 1); de draaiïng van 't filtraat was nog — 0,10°.

100 c.M.³ van 't filtraat werden ingedampt etc. als boven.

Gewicht aschvrije rest = 0,145 G. (gew. asch = 0,018 G.)

γ. 125 c.M.³ gedistilleerd water werden met huidpoeder behandeld geheel analoog aan β.

100 c.M.³ filtraat ingedampt en verascht gaven gewicht aschvrije rest = 0,004 G. (asch 0,001 G.)

Wij hebben dus:

In 100 c.M.³ looizuuroplossing bleef na behandeling met huidpoeder terug . . . . 0,145 G.

Het huidpoeder zelf gaf aan 100 c.M.³ oplossing af. 0,004 „

dus niet-looizuur + niet-opgenomen looizuur . . 0,141 G. in 100 c.M.³ looizuuroplossing.

Uit 100 c.M.³ werden dus door het huidpoeder opgenomen

0,562 — 0,141 = 0,421 G. looizuur.

1) Het huidpoeder werd te voren ter dege uitgewasschen met water en werd na afdroging tusschen filtreerpapier (met berekening van 't watergehalte) bij kleine hoeveelheden toegevoegd, welke methode meer looizuur doet opnemen dan het toevoegen in eens (zie later.)

De draaiïng der oplossing ging achteruit van — 1,50 tot — 0,10, dus

0,421 G. looizuur opgelost in 100 c.M.³ draaïen — 1,40°.

Aangenomen dat de draaïng evenredig is aan de concentratie dan wordt dit voor eene

1 °/₀ looizuuroplossing een draaiïng van — 3,33°.

Proef. 2. De looizuuroplossing draaide — 4,7°.

100 c M.³ gaven na indamping en drogen eene aschvrije rest van . . . . 1,730 G.

100 c.M.³ na behandeling met huidpoeder, eene aschvrije rest van . . . . 0,447 G.

100 c.M.³ water na behandeling met huidpoeder . . . . 0,024 „

niet-looizuur + niet-opgenomen looizuur. . . . . = 0,423 „

opgenomen looizuur uit 100 c.M.³. . 1,307 G.

De draaiïng der looizuuroplossing was door de inwerking van het huidpoeder achteruitgegaan van — 4,7 tot — 0,2°.

De opgenomen 1,307 G. looizuur draaiden dus — 4,50°.

d. i. dus voor eene 1 °/₀ oplossing eene draaiïng van — 3,44°.

Proef. 3. De looizuuroplossing vertoonde eene draaiïng van — 11,5° zij werd op ¹/₅ verdund en draaide nog — 2,30°, de draaiïng bleek hier dus proportioneel aan de concentratie.

100 c.M.³ gaven aschvrije rest . . . 0,785 „

100 c.M.³ „ „ „ na behandeling met huidpoeder . . . . . 0,145 G.

100 c.M.³ water na behandeling met huidpoeder . . . . 0,017 „

niet-looizuur + niet-opgenomen looizuur . . . 0,128 G.

opgenomen looizuur uit 100 c.M.³ oplossing . . 0,657 G.

De draaiïng was teruggegaan van — 2,30 tot-0,1°, dus 0,657 G. zuiver looizuur draaiden — 2,20°

d. i. dus voor eene 1 °/₀ oplossing eene draaiïng van 3,35°.

Het onderzoek van het zuivere poedervormige looizuur gaf de volgende resultaten:

Proef. 4. 0,3654 G. zuiver thee looizuur werden in water en de opgelost oplossing werd op 25 c.M.³ gebracht.

De draaiïng bedroeg — 4,10°,

d. i. voor eene 1 °/₀ oplossing eene draaiïng van — 2,80°.

Proef. 5. 0,619 G. looizuur (praeparaat uit eene andere hoeveelheid theeblaren) werden evenals bij proef 4 opgelost tot 25 c.M³.

De draaiïng bedroeg — 6,80°,

d. i. voor eene 1 °/₀ oplossing eene draaiïng van — 2,75°.

Als soortelijke draaiïng van het theelooizuur werd gevonden volgens de eerste methode (proeven 1, 2 en 3) — 3,33°; — 3,44°. en — 3,35° of gemiddeld — 3,373°,

terwijl de 2ᵉ methode (proeven 4 en 5) gaf — 2,80 en — 2,75 of gemiddeld — 2,775°.

Een onderzoek bracht de oorzaak van dit verschil aan 't licht.

Wanneer men het poedervormige looizuur in een exciccator tot constant gewicht droogt, en daarop in den droogstoof zet bij eene temperatuur van 105—110°, dan neemt het gewicht nog aanmerkelijk af; bij iets hoogere temperatuur nl. 115 à 120° gaat de gewichtsafname heel wat spoediger zoodat na twee dagen constant gewicht bereikt is.

Aangezien de mogelijkheid niet was uitgesloten, dat dit gewichtsverlies geheel of gedeeltelijk was te wijten aan het ontwijken van eene rest *chloroform*, hardnekkig vastgehouden door

het looizuur, zooals zoovele andere stoffen, werd eene hoeveelheid van het poedervormige looizuur in water opgelost en een gedeelte van 't water afgedistilleerd, om te zien of er ook chloroform mee overging; het resultaat was echter negatief, hetgeen door eene tweede proef met eene andere hoeveelheid looizuur werd bevestigd. Aangezien het looizuur bij deze wijze van droging niet merkbaar ontleed wordt, bleef er niet anders over, dan het ontwijkende te beschouwen als water n.l. òf als krystalwater, of als water van het looizuurmolecuul zelf onder anhydried-vorming.

Bepaling der ontwijkende hoeveelheid water gaf het volgende: 0,1184 G. te voren tot constant gewicht in een exciccator gedroogd looizuur gaven na droging bij 120° tot constant gewicht 0,0987 G. rest, dus was 0,0197 G. of 16,6 °/₀ water ontweken.

Hieruit volgt:

100 G. poedervorming looizuur = 83,4 G. bij 120° gedroogd.

De voor het op 120° gedroogde looizuur gevonden waarde moet dus met 0,834 worden vermenigvuldigd om te gelden voor het poedervormige product.

Als gemiddelde der 3 eerste proeven vinden wij dus berekend op poedervormig looizuur 0,834 × — 3,373 = — 2,81°, welke waarde nagenoeg overeenkomt met de in proef 4 en 5 gevondene.

Was uit het voorgaande reeds met vrij groote waarschijnlijkheid af te leiden, dat het theelooizuur werkelijk een constant draaiïngsvermogen bezit, zoo scheen het toch niet overbodig ten bewijze voor deze stelling verdere onderzoekingen in andere richting te doen.

Walden gebruikte voor het eikenlooizuur de dialyse benevens de gefractionneerde präcipitatie en het gefractionneerd uitschudden.

Voor het theelooizuur werd door ons de laatstgenoemde methode nog eens toegepast, die 't vlugste is uit te voeren en daardoor bij eene gemakkelijk ontleedbare verbinding als het theelooizuur de meeste waarborgen voor betrouwbaarheid geeft.

Eene hoeveelheid theelooizuur (wit poedervormig product)

werd in water opgelost; de oplossing werd daarop eenige keeren met azijnaether uitgeschud en in de verschillende fracties het looizuur en zijne soortel. draaiïng bepaald.

Proef. Circa 5 G. looizuur werden opgelost in water, de oplossing gebracht op ongeveer $^1/_2$ L. en uitgeschud met azijnaether.

a. 1e fractie.

Na afdamping van den azijnaether (voorzichtig bij niet te hooge temperatuur) werd opgevuld met water tot 200 c.M^3.

25 c.M^3 der goed dooreengemengde oplossing gaven na indamping en droging bij 120° tot constant gewicht 0,263 G. rest.

Om zoo goed mogelijk vergelijkbare resultaten te verkrijgen, werd elke fractie bij de polarisatie opgevuld met water totdat zij juist 1 °/₀ looizuur bevatte.

25 c M^3 der oplossing bevatten 0,263 G looizuur, dus
de overblijvende 175 c.M^3 bevatten 1,841 „ „ .
Zij werden dus opgevuld tot 1,841 c.M^3.
De draaiïng dezer 1°/₀ oplossing bedroeg 3,3°.

b. 2e fractie.

Na afdamping werd deze gebracht op 50 c.M^3.
20 c.M^3 werden ingedampt etc, en gaven een rest van 0,438 G.
in de overblijvende 30 c.M^3 waren dus aanwezig 0,657 „ looizuur;
zij werden opgevuld tot 65,7 c.M^3.
De 1°/₀ oplossing draaide — 3,4°.

c. 3e fractie.

Deze werd eveneens gebracht op 50 c.M waterige oplossing.
20 c.M^3 ingedampt gaven 0,216 G rest;
in de overblijvende 30 c.M^3 waren dus nog aanwezig 0,324 G looizuur
zoodat zij werden opgevuld tot 32,4 c.M^3.
de draaiïng bedroeg 3,4°.

De soortelijke draaiïng der 3 fracties was dus ongeveer dezelfde.

Uit de bovenstaande onderzoekingen schijnt te mogen worden

afgeleid, dat de soortelijke draaiïng van het theelooizuur eene vrij wel constante waarde is (nl. bij polarisatie steeds onder dezelfde omstandigheden van temperatuur en concentratie) waaruit zou volgen, dat wij hier naar alle waarschijnlijkheid werkelijk met eene *chemische verbinding* te doen hebben.

Voor de soortelijke draaiïng van het zuivere theelooizuur (poedervormig product) werd gevonden de waarde — 2,8° waarbij voor eene 4°/₀ dextrose-oplossing de draaiïng = + 4,0 gesteld is; voor dextrose hebben wij (α) D = + 52,6°, hieruit berekend voor theelooizuur (α) D = — 177,3°, welk cijfer wij echter onder eenig voorbehoud geven, aangezien de polarisaties niet nauwkeuriger konden worden uitgevoerd dan tot op 0,1° van den polarimeter.

Bewees ons de optische activiteit van het theelooizuurmolecule goede diensten bij het beantwoorden der vraag: „is het theelooizuur eene chemische verbinding of een mengsel", ook voor vele andere onderzoekingen omtrent het theelooizuur bleek zij eene belangrijke eigenschap te zijn, welke het onderzoek zeer ten goede kwam.

Niet alleen werd het hierdoor mogelijk om in zeer korten tijd het looizuurgehalte eener niet te sterk gekleurde oplossing nauwkeurig te bepalen, ook was zij bijv. een uitstekend middel om de zuiverheid eener looizuuroplossing te onderzoeken.

Omtrent het drogen van het poedervormige looizuur of van eene ingedampte looizuuroplossing bij 120° tot constant gewicht zij hier nog 't volgende opgemerkt.

Droogt men het poedervormige looizuur slechts gedurende een paar uren en weegt daarop, dan blijkt reeds ongeveer 10°/₀ van het gewicht verloren te zijn gegaan. Droogt men daarop verder telkens 2 uur lang met daarop volgende weging, dan blijkt dat het gewicht nog slechts zeer langzaam afneemt, tot, dat eerst na 2-3 dagen drogen constant gewicht is bereikt.

De oorzaak van dit verschijnsel moet hoogst waarschijnlijk worden gezocht in de aanwezigheid van krystalwater dat ge-

makkelijk ontwijkt. Bij verdere verwarming echter wordt dan het looizuurmolecule zelf aangegrepen en ontstaat onder ontwikkeling van nog meer water een anhydried.

Deze zienswijze wordt nog door het volgende bevestigd.

Het watervrije looizuur (2 uur gedroogd op 120°) vertoont nog alle eigenschappen van het looizuur vóor de verwarming. Een product echter verkregen door verwarming tot constant gewicht (gedurende eenige dagen) op 120° gaf de volgende reacties:

Smaak intensief bitter en niet meer adstringeerend; gemakkelijk *oplosbaar* in water, alhokol, azijnaether en aceton. Zoo goed als *onoplosbaar* in *aether*, ook in waterhoudenden. De kleur der oplossingen was bloedrood.

Lijmoplossing gaf slechts een gering opaliseeren.

Loodoplossing een bruin neerslag; $FeCl_3$ blauw.

Wij zien dat sommige characteristieke looizuurreacties zijn verdwenen.

E. Opname van het Theelooizuur door dierlijke huid.

Zooals wij boven reeds zagen, wordt ook het theelooizuur evenals vele andere looistoffen door dierlijke huid opgenomen. Deze belangrijke eigenschap, welke de looistoffen zoover bekend met geen andere natuurlijk voorkomende organische verbindingen gemeen hebben, is de oorzaak van hare uitgebreide toepassing in de techniek der leerlooiërij.

Door de opname van het looizuur verkrijgt de huid een zekere mate van resistentie tegen atmosferische invloeden, het looizuur werkt als een antiscepticum: de bacteriën, schimmels en andere nadeelige invloeden van buiten kunnen de „gelooide huid”, het *leer* daarna niet meer aangrijpen.

Ook in ander opzicht is de bedoelde eigenschap van het looizuur van groot belang.

Juist in de omstandigheid, dat geen andere organische stof deze eigenschap bezit, hebben wij een handig middel het looizuur van die stoffen te scheiden, om het quantitatief te bepalen.

Van de vele methoden die er in toepassing zijn gebracht voor de quantitatieve bepaling der looistoffen, zijn dan ook zeker die waarbij van huidpoeder wordt gebruik gemaakt in 't algemeen de nauwkeurigste.

Vandaar dat bijv. de officiëele methode der vereeniging van looizuurfabrikanten te Berlijn voor de bepaling van het looiënd vermogen eener „Gerbbrühe" berust op de opname van het looizuur door huid.

Evenwel ook deze methode heeft dikwijls niet geheel met de waarheid overeenstemmende resultaten, zooals uit de volgende onderzoekingen moge blijken.

Juist in de optische activiteit van het theelooizuur hadden wij een geschikt middel om de opname door huidpoeder nader te bestudeeren, doordat door polarisatie elk oogenblik het stadium der opname kon worden bepaald.

Schudt men eene looizuuroplossing nog zoo lang met huidpoeder, zij blijft steeds de reactie met $FeCl^3$ vertoonen m. a. w. een geringe rest blijft steeds in de vloeistof aanwezig en kan niet door het huidpoeder worden opgenomen.

De vraag was nu, door welke omstandigheden wordt de hoeveelheid niet opgenomen looizuur beheerscht, en op welke wijze is zij tot de kleinst mogelijke afmetingen terug te brengen?

Ter beantwoording dezer vraag werd vooreerst nagegaan, hoe snel de opname geschiedt en op welke wijze zij wordt gewijzigd, door het huidpoeder niet direct in zijn geheel, doch bij kleine porties telkens na eenig schudden en laten inwerken er bij te voegen.

Het gebruikte huidpoeder werd steeds vooraf een dag lang met gedistilleerd water gewasschen onder herhaald schudden en vernieuwing van 't water.

Het werd in vochtigen toestand met inachtneming van het watergehalte toegevoegd na droging tusschen filtreerpapier.

Eene looizuuroplossing werd bereid welke — 1,7° draaide volgens de schaal van den polarimeter van LAURENT 1).

a. Bij 50 cM^3 dezer looizuuroplossing werd gevoegd 3 G. huidpoeder en na 5 minuten inwerken onder herhaald schudden werd gefiltreerd.

Het filtraat draaide nog — 0,5°.

Het huidpoeder werd nu weer bij 't filtraat gevoegd, en herhaald geschud. Na 1 dag inwerken werd weer gefiltreerd.

De draaiïng was nog — 0,2°.

b. 50 cM^3 werden als bij a met 3 G. huidpoeder herhaald geschud; de inwerking duurde nu 15 minuten.

Het filtraat draaide nog — 0,4°.

Bij 't filtraat werd nog 1½ G. versch gewasschen huidpoeder gevoegd en wederom na herhaald schudden na 15 minuten inwerking gefitreerd.

Het filtraat draaide nog — 0,15°.

Nu werd het huidpoeder weer toegevoegd en den volgenden morgen gefiltreerd.

De draaiïng was nog — 0,1°.

c. 50 $c.M^3$. werden 3 kwartier lang als boven behandeld met 3 G. huidpoeder.

Het filtraat draaide nog — 0,3°.

Ook hier werd het huidpoeder weer toegevoegd en was den volgenden morgen de draaiïng nog — 0,2°.

d. 50 c. M^3 werden 10 minuten lang met 2 G. huidpoeder behandeld als boven.

Daarna werd nog 1 G. versch huidpoeder toegevoegd en vervolgens na 10 minuten inwerking nog 1 G.

Het filtraat draaide nog — 0,1°.

Het huidpoeder werd weer toegevoegd en werd ook hier na ongeveer 1 dag inwerking gefiltreerd.

---

1) zie pag. 34.

De draaiïng was nu nog geringer geworden en bedroeg niet meer dan —0,05°. (met den aanwezigen toestel niet nauwkeuriger te bepalen) terwijl ook de looizuurreactie vrij zwak was geworden.

Uit deze weinige proeven bleek reeds, dat het looizuur direct na toevoeging van het huidpoeder snel wordt opgenomen, doch dat deze snelheid van opname vrij spoedig vermindert, zoodat bij toevoeging van het huidpoeder in eens zelfs na een dag staan onder herhaald schudden nog eene noemenswaarde hoeveelheid looizuur in 't filtraat aanwezig is.

Voegt men het huidpoeder in kleine hoeveelheden toe bij tusschenpoozen van bijv. 10 minuten, dan herhaalt zich telkens bij nieuwe toevoeging de snelle werking van het versche huidpoeder en is in betrekkelijk korten tijd het looizuur tot op een geringe rest uit de oplossing verdwenen. Voor de quantitatieve bepaling van het looizuur is het dus gewenscht het huidpoeder niet ineens doch in gedeelten en met tusschenpoozen toe te voegen.

Een voorloopig onderzoek werd verder ingesteld naar den invloed welke verontreingingen der looizuuroplossing uitoefenen op de opname van het looizuur door huidpoeder.

Wij hebben hierbij te onderscheiden 2 groepen van stoffen, nl.
1ᵉ die verbindingen welke in de looizuuroplossing zijn opgelost, terwijl zij in water onoplosbaar zijn.
2ᵉ de in looizuuroplossing en in water beide oplosbare stoffen.

Dat de 1ᵉ dezer beide cathegoriën van verbindingen bij de quantitatieve bepaling van het looizuur door middel van huidpoeder een voor den onderzoeker minder aangename rol speelt ligt voor de hand, want wanneer het looizuur uit de oplossing wordt verwijderd, kunnen ook de hier bedoelde stoffen niet in oplossing blijven; zij worden dus met het looizuur neergeslagen en maken de resultaten onbetrouwbaar. Om dit te vermijden zou men deze stoffen vóór de toevoeging van het huidpoeder moeten verwijderen, doch dit is gemakkelijker gezegd dan gedaan, vooral met het oog op de eigenschap van het looizuur om ook deze stoffen hardnekkig vast te houden.

Het eenige zal dus zijn, de hoeveelheid dezer vreemde stoffen in eene aparte hoeveelheid oplossing te bepalen, zoo daarvoor ten minste eene methode is aangegeven of te vinden.

Alleen voor het *thee*looizuur hebben wij volgens voorgaande onderzoekingen in zijne optische activiteit een middel om door polarisatie eene vrij nauwkeurige quantitatieve bepaling te maken ook in tegenwoordigheid van genoemde onzuiverheden, wanneer ten minste deze stoffen niet optisch actief zijn; in dit geval zou ook deze methode ons in den steek laten.

Als voorbeelden van stoffen oplosbaar in eene looizuuroplossing en nagenoeg onoplosbaar in water noemen wij hier het quercitrine en sommige ontledingsproducten van het looizuur zelf, die o. a. in het waterig theeëxtract voorkomen.

De hier in 't kort gereleveerde onderzoekingen, alsook die omtrent den invloed van de in water *oplosbare* verbindingen, welke zich in de looizuuroplossing bevinden, op de opname van het looizuur door huidpoeder, zijn nog niet afgeloopen en zullen weer worden opgevat wanneer wij een meer volledige kennis hebben omtrent den aard van de hier bedoelde stoffen, waarna wij op deze belangrijke kwestie hopen terug te komen.

Alleen zij hier nog opgemerkt dat de bedoelde in water oplosbare stoffen de neiging schijnen te hebben om op de resultaten een tegengestelden invloed uit te oefenen als de in water onoplosbare. Door de attractie van het looizuur ook tot deze stoffen houden zij dit in de oplossing vast, hoewel zij ook voor een kleiner of grooter gedeelte met het looizuur neerslaan op het huidpoeder.

Deze attractie moet dan ook als de voornaamste oorzaak worden beschouwd waarom men door huidpoeder niet al het looizuur uit eene gegeven (gewoonlijk onzuivere) looizuuroplossing kan verwijderen.

F. Oxydatie van Theelooizuur door Chameleon.

Wij zagen reeds (zie p. 27) dat chameleon in eene waterige theelooizuuroplossing onder gasontwikkeling een neerslag teweegbrengt, hetwelk eerst geel gekleurd is, terwijl het bij toevoeging van meer chameleon steeds donkerder wordt.

In eene qualitatieve proef werd het gas nader onderzocht en bleek door eene kali-oplossing te worden opgenomen en met eene oplossing van kalkwater een neerslag te geven van koolzure kalk.

Het gas is dus koolzuur.

Om te onderzoeken of het eerst gevormde gele neerslag bij zijne verdere ontleding ook zelf nog meer koolzuur afsplitst, werd dit neerslag vóór de toevoeging van meer chameleon afgefiltreerd en uitgewasschen.

Nu werd het in water gesuspendeerd en opnieuw behandeld met chameleon. Ook nu ontwikkelde zich nog veel koolzuur welke ontwikkeling eerst tot staan kwam, toen het geheele neerslag in eene donkerbruine massa was overgegaan en de oplossing geheel helder was geworden.

Het bruine product werd na uitwassching met kokend water gedroogd en verascht.

Het bleek geen mangaan en slechts zeer weinig kali (hoogstwaarschijnlijk dit laatste als onzuiverheid) te bevatten.

Deze geheele reactie schijnt dus te bestaan in eene afsplitsing van koolzuur (waarschijnlijk de carboxyl-groep) onder opname van zuurstof uit de chameleon-oplossing, waarbij de overblijvende atoomgroepen (oxyverbindingen met benzolkern) zich polimeriseeren.

Het bruine oxydatieproduct bleek in alkohol gemakkelijk oplosbaar, minder goed in azijnaether en aceton en onoplosbaar in aether en benzine.

Het oxydatieproduct werd in heet water gesuspendeerd en na toevoeging van zwavelzuur verder bij hookhitte behandeld met chameleon in overmaat.

De oxydatie gaat nu verder steeds onder koolzuurontwikkeling, totdat het geheele neerslag is verdwenen en is overgegaan in koolzuur en water.

De hoeveelheid chameleon noodig voor de totale oxydatie van het looizuur werd in de volgende proeven bepaald.

De gebruikte chameleon- en oxaalzuuroplossing en hadden de volgende sterkte:
20 cM³ chameleon = 35,0 cM³ oxaalzuur.
„ „ oxaalzuur = 27,4 „ $\frac{1}{10}$ normaal alkali.

Hieruit is te berekenen 1 cM³ chameleon = 0,001515 G. chemisch zuiver kaliumpermanganaat.

Proef 1. 0,0604 G. zuiver poedervormig looizuur werden opgelost in water en de oplossing gebracht op 100 cM³.

a. 25 cM³ dezer oplossing werden na verdunning en toevoeging van verdund zwavelzuur eenigen tijd gekookt met overmaat der chameleon-oplossing, totdat het eerst ontstane neerslag (bij toevoeging van de chameleon uit de buret) weer geheel was opgelost en de oplossing de kleur had aangenomen van de verdunde chameleon-oplossing.
Nu werd teruggetitreerd met oxaalzuur tot geheel kleurlooze oplossing waaraan een druppel chameleon eene lichtroode kleur geeft welke door koken niet weer verdwijnt.
Gebruikt was 40,4 cM³ chameleon en 16,0 cM³ oxaalzuur. Berekend op de chameleon was dit 40,4 — 9,1 = 31,3 cM³ cham.

b. 25 cM³ werden als voren gekookt met 40,1 cM³ chameleon, en teruggetitreerd met 17,4 cM³ oxaalzuur. Berekend op chameleon was dit 40,1 — 9,9 = 30,2 cM³ cham.

c. 25 cM³ werden behandeld als voren.
Gebruikt 36,2 cM³ chameleon en 10,5 cM³ oxaalzuur.
Berekend op chameleon: 36,2 — 6,0 = 30,2 cM³ cham.

Voor 25 cM^3 der looizuuroplossing was dus gemiddeld gebruikt (31,3 + 30,2 + 30,2): 3 = 30,57 cM^3 chameleon.
= 0,0461 G kaliumpermanganaat;

$\frac{0,0604}{4}$ = 0,0151 G. looizuur reduceeren 0,0461 G. permanganaat

dus 1 G „ reduceert 3,07 G „
of 1 G permanganaat oxydeert 0,325 G looizuur.

Proef 2. 0,270 G. zuiver poedervormig looizuur werden in water opgelost en als boven geoxydeerd met chameleon-oplossing.

Gebruikt werden 51,9 cM^3 chameleon en 0,5 cM^3 oxaalzuur.

Berekend op chameleon dus gebruikt 5,16 cM^3 of voor oxydatie van 1 G. looizuur „ 2,88 G. cham.

Proef 3. 0,0254 G. looizuur (ander präparaat) werden in water opgelost en geoxydeerd als boven.

Gebruikt 50,9 cM^3 chameleon en 0,2 cM^3 oxaalzuur.

Berekend op chameleon gebruikt 50,8 cM^3.

Voor 1 G. looizuur dus gebruikt 3,00 G. chameleon.

In een 3-tal goed overeenstemmende proeven was dus als gemiddelde gevonden dat voor de totale oxydatie van 1 G. looizuur noodig zijn (3,07 + 2,88 + 3,00): 3 = 2,98 G. permanganaat, of dat 1 G. permanganaat 0,336 G. looizuur oxydeert.

Het spreekt wel van zelf dat men voor dit onderzoek moet uitgaan van een zuiver präparaat, want de onzuiverheden kunnen natuurlijk een geheel ander reduceerend vermogen bezitten; aangezien de meeste vreemde stoffen waarmee het looizuur kan verontreinigd zijn heel wat geringer reductievermogen bezitten, vindt men dan allicht kleinere waarden dan de boven gevondene.

G. Acetylderivaat van het Theelooizuur.

Wanneer men het poedervormige looizuur overgiet met azijnzuur-anhydried dan lost het daarin gemakkelijk op. Kookt men de oplossing eenige uren lang aan een opgaande koelbuis, dan

verkrijgt men bij uitgieten van het afgekoelde reactie-product in veel water een sterk vlokkig, nagenoeg wit neerslag, terwijl het water nu geen looizuur-reactie (met $Fe\,Cl_3$) meer vertoont. Al het looizuur is hierbij overgegaan in eene acetylverbinding, die in water nagenoeg onoplosbaar is.

Voor de acetyleering van looistoffen wordt gewoonlijk 6 uren gekookt, doch bleek uit eenige proeven met theelooizuur dat hier de acetyleering onder niet ongunstige omstandigheden heel wat eerder totaal is afgeloopen.

Om den tijd noodig voor de totale omzetting vast te stellen, werd de volgende proef genomen.

Eene hoeveelheid poedervormig looizuur werd opgelost in overmaat van azijnzuur-anhydried en nu verwarmd; van tijd tot tijd werd eenvoudig een proefje uit de oplossing genomen, in water uitgegoten en onderzocht op looizuur.

a. Direct na oplossing zonder verwarming:
geen neerslag bij uitgieten in water; sterke looizuur-reactie.

b. Na verwarming tot 100° in een waterband:
In water gering neerslag; sterke looizuur-reactie.

c. Na $^1/_4$ uur koken aan opgaanden koelbuis:
In water reeds sterk wit neerslag; looizuur-reactie zwak.

d. Na nog $^1/_4$ uur koken:
In water sterk neerslag; geen looizuur-reactie.

Reeds na $\frac{1}{2}$ uur koken was dus al het looizuur overgegaan in acetylderivaat.

Aangezien echter de mogelijkheid niet was uitgesloten dat het eerst gevormde acetylderivaat later nog meer acetyl opnam bij verdere acetyleering, werd voor alle zekerheid steeds eenige uren lang gekookt.

Neemt men groote overmaat van azijnzuur-anhydried, dan is het product na uitgieten in water eerst dikvloeibaar, wordt echter spoedig vast.

Ter zuivering van het acetylderivaat kan men het in de zon gedroogde product nog eens oplossen in warmen alkohol en uitgieten in met zwavelzuur aangezuurd water.

Is het water vooraf niet zuur gemaakt, dan vormen zich geen vlokken; het acetylderivaat slaat (voor een deel althans) in zeer fijn verdeelden toestand neer en is later moeilijk af te filtreeren.

Het eenigszins zandige nu volkomen witte neerslag wordt na eenig staan op 't filter gebracht, met water uitgewasschen tot neutrale reactie en gedroogd in de zon.

Zoo noodig wordt dit zuiveringsproces nog eens herhaald met ander oplosmiddel, bijv. ijsazijn of aceton.

In aceton, azijnaether, ijsazijn, chloroform is het acetylderivaat zeer gemakkelijk oplosbaar.

In kouden alkohol veel moeilijker; vrij gemakkelijk in warmen.

In water en verdunde zuren is het nagenoeg geheel onoplosbaar.

Ook benzine en petroleumaether lossen het niet op.

Het op de beschreven wijze gezuiverde en boven zwavelzuur tot constant gewicht gedroogde product werd aangewend voor de verdere onderzoekingen omtrent de constitutie.

Eenige elementair-analyses gaven de volgende resultaten:

a. 0,0836 G. substantie gaven 0,1756 G. CO_2 en 0,0326 G. H_2O; samenstelling hieruit berekend:
57,3 % C. en 4,3 % H.

b. 0,1470 G. substantie gaven 0,3106 G. CO_2 en 0,0618 G. H_2O; samenstelling volgens deze cijfers:
57,65 % C. en 4,67 % H.

c. 0,1150 G. substantie gaven 0,2417 G. CO_2 en 0,0484 G. H_1O; hieruit berekend:
57,35 % C. en 4,68 % H.

Het gemiddelde uit de 3 analyses is:
57,43 °/₀ koolstof en 4,55 °/₀ waterstof.

De bepaling van het *acetyl*-gehalte leverde eenige moeilijkheden. Verzeeping met normaal-alkali en terugtitreeren met normaal-zuur gaf veel te hooge resultaten wat zeker te wijten is aan de omstandigheid dat èn de acetylrest èn de looizuurrest kali opneemt.

Verzeeping door eenigen tijd koken met alkoholische kali, afdestilleeren van het azijnzuur uit zwavelzure oplossing en titreeren van het overgegane azijnzuur gaf zeer uiteenloopende resultaten (van 41 tot 55 °/₀ acetyl). Vermoedelijk gaat hierbij de reactie verder onder afsplitsen van vluchtige zuren. Na uren lange destillatie was het overgaande nog steeds zuur.

Nu werd de omgekeerde weg ingeslagen nl. eene gewogen hoeveelheid poedervormig looizuur werd geacetyleerd en de hoeveelheid acetylderivaat door uitgieten in veel water, filtreeren, uitwasschen van de rest op 't filter en drogen tot constant gewicht (ten laatste in een exciccator) quantitatief bepaald.

Proef 1. Uit 1,590 G. looizuur werd verkregen 2,338 G. acetylderivaat.

Proef. 2. Uit 0,3817 G. looizuur (ander praeparaat) werd verkregen 0,5605 G. acetylderivaat.

Het gehalte aan acetyl rest (CH_3CO-H) is dus volgens proef 1 berekend 32,05 °/₀.
en volgens proef 2 31,90 °/₀.
Gemiddeld dus 31,98 °/₀.

Ter bepaling van het moleculairgewicht van het acetylderivaat werd de elegante methode van Lansberger 1) toegepast.
Als oplosmiddel werd zuivere aceton genomen, dat vooraf nog eens werd gedestilleerd en vrij wel constant kookpunt had.

1) Berl. Ber. 1898 p. 458.

Ter contrôle der verkregen resultaten werd vòòr en nà dien het moleculairgewicht van kamfer ($C_6H_{16}CO = 152$) bepaald.

Proef 1. Moleculairgewicht kamfer.
Substantie 0,6736 G. aceton 7,496 G.
Kookpunt aceton 55,66°.
„ oplossing na circa 2 min. constant op 56,65°.
Hieruit berekend moleculair-gewicht 151.

Proef 2. Moleculairgewicht acetylderivaat.
Substantie 1,3680 G. aceton 7,33 G.
Kookpunt aceton 55,61°.
Temperatuur constant op 56,105° (na circa $2^1/_4$ minuut).
Hieruit berekend moleculairgewicht = 631.

Proef 3. Gewicht acetylderivaat 0,6499 G. aceton 6,60 G.
Kookpunt aceton 55,63°.
Temperatuur oplossing constant op 55,88°.
Berekend moleculair gewicht = 658.

Proef 4. Gewicht acetylderivaat 0,8701 G. aceton 7,54 G.
Kookpunt aceton 55,40°.
Temperatuur oplossing constant op 55,69°.
Berekend moleculairgewicht = 664.

Proef 5. Gewicht kamfer 0,6294 G.; aceton . . 7,24 G.
Kookpunt aceton 55,43°.
Temperatuur oplossing constant op 56,40°.
Moleculairgewicht kamfer = 150.

De voor kamfer gevonden moleculairgewichten komen beide vrij wel overeen met de berekende waarde.

Het gemiddelde uit de 3 gevonden waarden voor het moleculairgewicht van 't acetylderivaat is 651.

H. Verdere onderzoekingen omtrent de samenstelling van het Looizuur-molecule.

Een 2-tal *moleculair-gewichtsbepalingen* van het poedervormige product gaven de volgende resultaten:

Voor deze bepalingen werd weer de methode van Lansberger gebruikt met aceton als oplosmiddel.

Een voorproef met naphtaline ($C_{10} H_8 = 128$) gaf een moleculairgewicht van 130, dus vrijwel overeenkomende met de theoretische waarde.

Proef 1. Gewicht theelooizuur 1,085 G.; aceton 7,425 G.
Kookpunt aceton 55,5°.
Temperatuur oplossing constant op 55,89°.
Hieruit berekend moleculairgewicht = 503,5.

Proef 2. Gewicht theelooizuur = 0,8026 G.: aceton 6, 84 G.
Kookpunt aceton = 55,9°.
Temperatuur oplossing constant op 55,865°.
Hieruit berekend moleculairgewicht = 502. 1)

De *aciditeit* van het theelooizuur werd als volgt bepaald:

Eene gewogen hoeveelheid wit poedervormig product werd snel in veel water opgelost verwarmd en onder vlijtig roeren getitreerd met $\frac{1}{10}$ normaal alkali; als indicator werd phenolphtaleïne gebruikt.

Proef 1. Gewicht looizuur = 0,254 G.
gebruikte hoeveelheid normaal-alkali 5,2 cM^3.

Proef 2. Gewicht looizuur = 0,246 G.
gebruikte hoeveelheid alkali = 4,8 cM^3.

Om hieruit de aciditeit te bepalen moet eerst het moleculairgewicht van 't looizuur zijn vastgesteld, waarvoor de directe bepalingen natuurlijk niet voldoende zijn. Voor een moleculair-

---

1) Een präparaat zuivere tannine (galnotenlooizuur) gaf een moleculairgewicht van circa 1300 (Isabanejew vond 1?25).

Dit product werd geacetyleerd, en daarop ook van dit acetylderivaat het moleculairgewicht bepaald.

Gevonden werd in 2 bepalingen 1070 en 1040, terwijl pentacetyldigalluszuur een mol. gew. zou hebben van 542.

gewicht van omstreeks 500 zouden de hier gevonden waarden ongeveer overeenkomen niet eene aciditeit van 1. Voor eene definitieve vaststelling der aciditeit dienen echter meerdere gegevens te worden verzameld.

Eenige elementairanalyses van het witte poedervormige product gaven de volgende waarden.

(Hierbij werd voor elke analyse een nieuw präparaat bereid).

a. 0,2910 G. substantie (onder 't wegen 0,0028 G. toegenomen) gaven 0,5854 G. koolzuur en 0,1283 G. water.

Hieruit berekend 54,9 °/₀ C. 4,9 °/₀ H.

b. 0,3418 G. substantie gaven 0,6825 G. CO_2 en 0,1479 G. H_2O.

Hieruit berekend 54,44 °/₀ C. en 4,81 °/₀ H.

c. 0,1530 G. substantie gaven 0,2901 G. CO_2 en 0,0658 G. H_2O.

Hieruit berekend 54,40 °/₀ C. en 4,77 °/₀ H.

Het gemiddelde uit de 3 gevonden waarden is 54,6 °/₀ C. en 4,8 °/₀ H.

Verder werd nog eene analyse gemaakt van het krystalwatervrije looizuur verkregen door 2 uren verwarmen in een droogstoof op 120°. Het poedervormige looizuur bleek hierbij 10,5 °/₀ water te verliezen. De kleur was nagenoeg wit gebleven.

0,426 G. substantie gaven 0,964 G. CO_2 en 0,155 H_2O.

Hieruit berekend 60,20 °/₀ C. en 3,95 °/₀ H.

In zijn werk „The Tannins" beschrijft H. Trimble een aantal looizuren van verschillende afkomst die daarop worden gerangschikt in 2 groepen, nl.:

1ᵉ groep, die van *galnotenlooizuur*; 2ᵉ groep, die van het *eikenlooizuur.*

De gemiddelde samenstelling dezer beide groepen is

	Groep I	Groep II.
Koolstof	52,17 °/₀	60,00 °/₀
Waterstof	3,00 „	5,00 „

Tot de eerste groep rekent Trimble behalve het galnotenlooizuur nog dat uit bast en hout van kastanjes, uit den bast der granaatappel en het sumachlooizuur.

De 2e groep omvat de looizuren uit eikenbast, mangrove, kina, catechu, tormentil etc.

Eenige afwijkende reacties dezer beide groepen zijn:

	Groep I.	Groep II.
Ferrizouten	blauwe kleur met präc.	groene kleur met präc.
Kalkhydraat	wit neerslag dat blauw wordt.	licht rose (pink) neersl. dat rood en bruin wordt.
Broomwater	geen neerslag	geel neerslag, dat bruin wordt.

Vergelijken wij met deze 2 groepen de voor het theelooizuur gevonden eigenschappen:

Samenstelling van het krystalwatervrije looizuur (ook de door TRIMBLE beschreven en door verschillende onderzoekers bestudeerde looizuren werden waarschijnlijk alle in krystalwatervrijen toestand onderzocht nl. na droging op of boven 100° tot constant gewicht).

Koolstof 60,2 pCt., waterstof 3,95 pCt.

reacties

Ferrizouten blauwe kleur en präc. (als groep I).

Kalkwater wit präc. dat blauw en daarna bruin wordt.

Broomwater geel präc. dat niet verandert.

Wij zien dat het theelooizuur met geen van beide groepen overeenkomt en zoowel in samenstelling als in eigenschappen tusschen beide in staat.

Uit eene procentische samenstelling van circa 60 pCt. C en 4 pCt. H voor het watervrije product zou eene moleculair-verhouding volgen van $C_{20}.\ H_{16}.\ O_{9}.$ (mol. gew. 400), en voor het waterhoudende circa $C_{20}.\ H_{22}.\ O_{12}$ („ „ 454)

Alvorens wij echter op speculaties omtrent de constitutie van het molecule ingaan, achten wij verder onderzoek speciaal ook van de ontledingsproducten van het theelooizuur noodzakelijk.

Omtrent de plaats welke het theelooizuur zal innemen in het schema der klassificatie van looistoffen van KUNZ-KRAUSE [1]) zal dan ook wellicht nadere mededeeling kunnen worden gedaan.

1) Parmac. Centralhalle XXXIX No. 23.

HOOFDSTUK III.

KORTE BESCHOUWING OMTRENT EENIGE ANDERE OPLOSBARE BESTANDDEELEN VAN HET THEEBLAD.

A. De met het Looizuur door azijnaether in oplossing gegane stoffen.

Wordt het azijnaetherextract na afdamping van den azijnaether opgenomen in water, dan ontstaat eene geringe troebeling die bij toevoeging van een weinig zwavelzuur zich in vlokken afscheidt en gemakkelijk af te filtreeren is.

De rest op het filter bleek te bestaan uit een harsachtig nietglycosidisch product plus een weinig chlorophyl.

Voor de bereiding van het zuivere theelooizuur werd zooals wij zagen het filtraat herhaaldelijk uitgeschud met azijnaether, waarbij de eerste fracties verworpen werden. Of in deze fracties misschien ook nog een ander looizuur aanwezig is, kan tot dusverre niet met zekerheid worden beslist; waarschijnlijk is het echter niet, aangezien ook het na zuivering hieruit verkregen poedervormige product nagenoeg even sterk naar links draaide als het zuivere theelooizuur.

Een der stoffen welke de eerste looizuurfracties verontreingen is eene quercitrine-achtige verbinding, die o. a. volgens Tretzel 1) bij koken met zwavelzuur quercetine afsplitst.

Tretzel kookte de (onzuivere) looizuuroplossing na uitschudden met aether een uur lang met verduud zwavelzuur en schudde daarop weer met aether uit. Na afdamping van den aether behield hij een gele rest die voor een deel onoplosbaar was in

1) loc. cit.

water. Het in water onoplosbare gedeelte werd uit verdunde alkohol omgekrystalliseerd en bestond toen uit mikroscopische naaldjes, welke Tretzel identiek verklaarde met quercetine.

Een nader onderzoek dezer verbinding, die in vrij groote hoeveelheid in de thee bleek aanwezig te zijn, scheen gewenscht, speciaal ook om te kunnen constateeren of deze verbinding wellicht bij de fabrikatie een rol speelt; daarvoor was echter noodig de hoeveelheid er van te kunnen bepalen zoowel in het gedroogde blad als in de bereide thee.

Uitschudden door äther was daarvoor niet geschikt, daar hierbij steeds vrij veel looizuur mee in oplossing gaat, hetwelk bij opname in water de gele stof weer voor een deel mee oplost.

Een zeer bruikbaar extractiemiddel voor de gele in water onoplosbare verbinding bleek te zijn een mengsel van chloroform en azijnaether van het soortelijk gewicht 1,224, waarin nagenoeg geen looizuur oplost, terwijl de gele verbinding daarin gemakkelijk bleek over te gaan.

Het op deze wijze verkregen product werd gezuiverd door 2 keer omkrystalliseeren uit verdunden warmen alkohol en bestond toen uit een citroengele krystalmassa van goed uitgegroeide mikroscopische naalden.

Of het verkregen zuivere product identiek is met quercetine moge uit de volgende eigenschappen blijken; ter vergelijk zijn de eigenschappen van het quercetine 1) hierbij opgegeven:

Oplosbaarheid	*Gele verbinding uit thee*	*quercetine*
koud water	nagenoeg onoplosbaar	idem
warm „	zeer weinig oplosbaar	idem
kouden alkohol	„ gemakkelijk „	zeer moeilijk oplosbaar
warmen „	„ „ „	beter dan koud
aether	gemakkelijk „	moeilijk „
chloroform en benzine	onoplosbaar	
azijnaether en aceton	gemakkelijk	
Reacties der alkoholische oplossing		
weinig verd. kali of ammoniak:	eerst groen, dan geel bij verwarming geel	geel, bij verwarming rood

1) Volgens van Rijn »Die Glycoside".

meer alkali	geel		geel
alkoh. loodoplossing	steenrood	volledig neerslag	rood
Smeltpunt	wordt bij 280° bruin zonder te smelten		250° (?)

Uit dit voorloopig onderzoek schijnt men te moeten opmaken dat de bewuste uit thee geïsoleerde verbinding, hoewel veel overeenkomst vertoonende, met quercetine met deze stof niet identiek is.

Voor de vaststelling der methode ter quantitatieve bepaling van de quercetine-achtige stof was vooreerst noodig te onderzoeken of misschien deze stof ook in het chloroform-extract of in de door azijnaether geëxtraheerde rest aanwezig was.

Het chloroform-extract werd in alkohol opgelost en eenigen tijd met verdund zoutzuur gekookt. Daarop werd de alkohol voor een deel afgedampt en weer water toegevoegd.

Nu werd herhaald uitgeschud met chloroform en toen dit niet meer gekleurd werd, volgde uitschudding met het mengsel van azijnaether en chloroform. Er werd geen spoor van de gele verbinding verkregen.

Daarop werd het alkohol-extract nog op de aangegeven wijze onderzocht. Hierin bleek nog een zeer geringe hoeveelheid aanwezig te zijn, echter te weinig om bij de quantitatieve bepaling gewicht in de schaal te leggen.

Vervolgens werd nagegaan of de quercetineachtige verbinding uit de waterige en looizuurhoudende oplossing door koken met zwavelzuur en daarop gevolgd uitschudden quantitatief was te verkrijgen. Het resultaat van dit onderzoek was, dat na korten tijd koken (hoogstens een kwartier) en na afkoeling twee keer uitschudden met het mengsel, de bedoelde stof in zijn geheel in het oplosmiddel was overgegaan. Langer koken gaf geen quercetine (?) meer en door herhaald uitschudden werden nog slechts sporen verkregen. De uitvoering der methode was nu als volgt:-

Het azijnaether-extract wordt in water opgenomen, daarop wordt verdund zwavelzuur toegevoegd, gefiltreerd en 't filtraat korten tijd gekookt. Na afkoeling (er heeft zich geen neerslag

gevormd) wordt 2 keer uitgeschud met het bedoelde mengsel. De verkregen oplossing wordt afgedampt, in zeer weinig alkohol opgenomen, neergeslagen met veel water en na filtratie met het filter na droging op 100° gewogen.

Gevonden werd volgens deze methode in een monster gedroogd blad 1,1 pCt., in fabrieksthee van dezelfde partij blad 1,0 pCt. in een ander bladmonster 0,9 pCt. in fabrieksthee van dezelfde partij blad 0,9 pCt.

De hier beschreven verbinding schijnt dus bij de fabrikatie geen noemenswaarde rol te spelen.

B. Het Glycosied der Theebladeren.

Wordt het poeder van versch gedroogde theebladeren met 90 percentigen alkohol geëxtraheerd, dan zet zich in de kolf eene lichtbruine substantie af. Giet men de bovenstaande vloeistof af, dan houdt men eene stroopige massa over.

Met veel alkohol van 90°/₀ verwarmd, lost de massa daarin op; bij afkoeling van den alkohol ontstaat echter weer een vlokkig nagenoeg wit neerslag dat zich op den bodem zet en weer in eene stroopige massa overgaat.

Kookt men nu de massa eenigen tijd met watervrijen azijnaether uit, dan gaan daarin sporen van looizuur over en de massa blijft in volkomen vasten toestand terug.

In water lost zij zeer gemakkelijk op met lichtbruine kleur, slaat echter door aceton, azijnaether of absoluten alkohol weer daaruit neer.

Aangezien het verkregen product geen theelooizuur kon zijn, en toch nog steeds met ferrichoride eene blauwkleuring gaf, was het waarschijnlijk dat wij hier nog steeds met een onzuiver product te doen hadden.

Pogingen om het product in zuiverder en looizuurvrijen toestand te verkrijgen leidden tot de volgende bereidingswijze.

Het bladpoeder wordt gemengd met 15°/₀ water en geëxtraheerd met aceton.

Door uitspreiding aan de lucht wordt de aceton uit het poeder verwijderd en nu wordt verder met alcohol van 90°/₀ geëxtraheerd.

Het extract wordt wat ingedampt en daarop absolute alkohol toegevoegd waardoor een wit vlokkig neerslag onstaat.

Het verkregen product wordt na afgieten van den alkohol in weinig water opgelost en in absoluten alkohol uitgegoten.

Deze bewerking wordt snel nog eens herhaald, waardoor een product wordt verkregen, dat in waterige oplossing met eene lijmoplossing geen neerslag meer geeft, en dat dus looizuurvrij is te noemen.

Het verkregen, nagenoeg witte, poeder heeft de volgende eigenschappen.

In chloroform, aether, benzine, azijnaether en aceton is het onoplosbaar.

In absoluten alkohol lost het slechts zeer weinig op; meer in kouden alkohol van 90 °/₀ en nog beter in warmen verdunden alkohol.

In water en ijsazijn en dus ook in verdund azijnzuur is het zeer gemakkelijk oplosbaar.

De verdunde waterige oplossing geeft de volgende reacties:

IJzerchloride geeft een blauw neerslag. Of deze blauwe kleur misschien is toe te schrijven aan de aanwezigheid van een spoor looizuur, is vooralsng niet met zekerheid te zeggen. Na herhaalde zuivering van het glycosied was het neerslag met ijzerchloride geel, doch was waarschijnlijk daarbij al het glycosied ontleed.

Loodacetaat geeft een geel neerslag oplosbaar in azijnzuur.

Kaliumpermanganaat geeft in zwavelzure oplossing geen neerslag van phlobapheen zooals bij het looizuur, doch wordt het in de warmte gretig gereduceerd.

Lijmoplossing geeft geen neerslag.

Huidpoeder neemt het niet op, zooals uit een paar quantitatieve proeven bleek:

Koken met zwavelzuur, neutraliseeren der zure oplossing en neerslaan met loodacetaat, geeft in 't kleurlooze filtraat sterke reductie van Fehling's proefvocht, hetgeen wijst op aanwezigheid van suiker, of andere reduceerende stof.

Dat deze suiker niet als zoodanig aanwezig was in de oorspronkelijke oplossing werd daardoor bewezen, dat na neer slaan met loodacetaat de Fehling sche oplossing niet werd gereduceerd.

Bij eenige quantitatieve proeven werd uit het gezuiverde nagenoeg witte poeder 15 à 25 % reduceerende suiker verkregen.

Een onderzoek naar den aard van de bij koken met zwavelzuur ontstane reduceerende verbinding gaf tot resultaat, dat bij verwarming der azijnzure oplossing gedurende eenigen tijd met phenylhydrazine er een onoplosbaar geel *osazon* wordt gevormd, dat onder 't mikroscoop gezien bleek te bestaan uit intensief citroengele goed uitgegroeide krystalnaalden.

Hiermee is bewezen dat de reduceerende stof ontstaan bij koken met zwavelzuur een *suiker* is en dat dus het poeder bestaat (in elk geval voor een groot deel) uit eene glycosidische verbinding, die wij voorloopig „*theeglycosied*" zullen noemen in afwachting dat hare eigenschappen en chemische constitutie nader zullen zijn bepaald, wanneer het eerst gelukt is deze verbinding in gekrystalliseerden zuiveren toestand te verkrijgen.

Het gekrystalliseerde osazon werd afgefiltreerd, gewasschen en gedroogd in een exciccator.

Als smeltpunt werd gevonden 198° (niet gecorrigeerd) hetwelk ongeveer overeenkomt met dat van het *glycosazon* (S. P. 202°), zoodat de suiker welke in het glycosied voorkomt wellicht glycose (dextrose) is.

Bij verbranding van het poedervormige glycosied blijft een aanzienlijke hoeveelheid asch terug, welke bij het op de boven aangegeven wijze gezuiverde poeder geheel bleek te bestaan uit *kaliumcarbonaat*.

Het glycosied zou dus volgens dit onderzoek een kaliumzout moeten zijn.

Het kaligehalte kan natuurlijk eerst dan nauwkeurig worden bepaald, wanneer wij zekerheid hebben daarbij van het chemisch zuivere product uit te gaan.

Toch werden ter oriënteering eenige kalibepalingen gedaan in verschillende präparaten welke een gehalte van 8,8 à 9,0 °/₀ kali (K_2O,) gaven.

Stikstof is in het glycosied niet aanwezig volgens een paar bepalingen naar de methode van KJELDAHL.

Wordt de waterige oplossing voor zich of met zwavelzuur eenigen tijd gekookt dan kleurt zij zich bruin, blijkbaar door ontleding. Ook bij indamping der oorspronkelijk bijna kleurlooze oplossing blijft een bruine rest achter, die in water slechts gedeeltelijk meer oplost. De in water onoplosbare bruine rest is oplosbaar in waterhoudenden azijnaether en in alkohol.

Dat het „theeglycosied" bij de theefabrikatie eene belangrijke rol moet spelen, blijkt wel daaruit, dat in de bereide thee bijna geen glycosied meer aanwezig is.

Wordt nl. het poeder van thee (zwarte) op dezelfde wijze geëxtraheerd als te voren werd aangegeven voor het bladpoeder, dan levert het alkoholextract bij verbranding slechts zeer weinig kali (eenige quantitatieve proeven gaven 0.1 tot 0,2 pCt. van het theepoeder), terwijl het in water oplosbaar gedeelte van het alkoholextract (na verwijdering van verontreinigingen als looizuur, bruine ontledingsproducten etc.) na koken met zwavelzuur Fehlings proefvocht zoo goed als niet reduceert.

Proeven ter onderzoek of het glycosied wellicht bij zijne ontleding tijdens de fermentatie eene vluchtige welriekende olie de theeölie afscheidt 1) gaven wel eenige aanduiding welke dit waarschijnlijk maken, doch zijn de onderzoekingen in deze richting nog niet genoegzaam gevorderd om daarover reeds een oordeel uit te spreken, en hopen wij op deze kwestie later uitvoeriger terug te komen.

Een onderzoek naar vrije *suiker* in de theeblaren en in de

---

1) Analoog aan de ontleding aan het glycosied myronzure kali door emulsine in kalium hydrosulfaat, suiker en de aetherische mosterdolie.

thee gaf slechts geringe hoeveelheden in beide n.l. van 0,2 tot 0,4 pCt.

De suiker bleek rechtsdraaiënd te zijn en zal waarschijnlijk glycose zijn. De suiker gaat bij de alkoholextractie met het glycosied in oplossing. Bij de zuivering van het glycosied blijft zij echter in de oplossing achter.

C. De in Alkohol onoplosbare, doch in Water oplosbare Bestanddeelen van het Theeblad.

Worden de met alkohol van 90 °/₀ totaal geëxtraheerde blaren na verwijdering van den alkohol met water gekookt, dan gaat nog een vrij groot gedeelte daarvan in oplossing.

Het water neemt eerst eene gele en na eenig koken langzamerhand eene lichtbruine kleur aan.

Eene heldere oplossing verkrijgt men als volgt:

Het bladpoeder wordt in een Soxleth's extractor met alkohol van 90 °/₀ geëxtraheerd totdat niets meer in oplossing gaat. De rest der blaren wordt in dunne laag aan de lucht uitgespreid, zoodat de alkohol bij gewone temperatuur snel verdampt.

Nu wordt het poeder in een lange verticale buis gedaan, die beneden vernauwd en met een wattenprop gesloten is. Op het poeder wordt nu kokend water gegoten, dat eerst lichtbruin daarna geel en eindelijk kleurloos afloopt.

De verkregen oplossing wordt met beenderenkool eenigen tijd gekookt en blijkt dan na filtratie nog slechts lichtgeel gekleurd te zijn.

Het koken met beenderenkool heeft meteen ten doel om geringe hoeveelheden looizuur en glycosied, die daarin worden opgenomen, te verwijderen.

Het verkregen extract geeft met alkohol of aceton een zeer volumineus gallertachtig neerslag, hetwelk in hoofdzaak bleek te bestaan uit:

Pectinezure kali,

Oxaalzure kali,

Phosporzure kali en pentosanen.

Wordt het extract na indamping verbrand, dan bevat de asch behalve kaliumcarbonaat en kaliumphosphaat nog geringe hoeveelheden *zwavelzuur*, en sporen *chloor*, *kalk* en *natrium*.

Dampt men de waterige oplossing voorzichtig in en laat men daarna de verkregen stroop eenigen tijd aan de lucht staan, dan vormen zich daarin vrij groote krystallen, die na afspoeling met water geïdentificeerd werden als het normale oxaalzure kali; dit zout is waarschijnlijk als zoodanig in de plant aanwezig en wel in vrij groote hoeveelheid.

Quantitatief werd de oxaalzure kali in het waterig extract bepaald door neerslaan met chloorcalcium in azijnzure oplossing laten bezinken van het fijn verdeelde neerslag, afhevelen, oplossen en nog eens neerslaan op de zelfde wijze, filtreeren en wegen als koolzure kalk.

In een paar monsters bladpoeder werd gevonden 1,1 pCt. terwijl in de bereide thee 1,2 pCt. werd geconstateerd.

Bij de fabrikatie speelt het dus waarschijnlijk geen belangrijke rol, daar men het in de bereide thee terugvindt.

De smaak moet echter op dien der thee eenigen invloed uitoefenen, aangezien het vrij onaangenaam zeepig smaakt en in kleine hoeveelheden in het thee-aftreksel aanwezig is.

De phosphorzure kali in het waterig extract gevonden bevat bijna al het phosphorzuur dat in het blad aanwezig was, aangezien de asch der andere extracten (chloroform-, azijnaether- en alkoholextract) en ook van de onoplosbare rest sporen phosphorzuur vertoonen.

Het phosphorzuurgehalte van het gedroogde blad is ongeveer 1 pCt. volgens onderzoekingen van VAN ROMBURGH en LOHMANN en anderen, hetgeen berekend op het dikaliumphosphaat wordt 1,9 pCt., waarvan circa 1,8 pCt. in het waterig extract voorkomen.

Bij de fabrikatie speelt ook deze verbinding waarschijnlijk geen groote rol, aangezien zij in ongeveer even groote hoeveelheid in de thee (n.l. in 't waterig extract daarvan) werd teruggevonden.

De pectinezure kali, eene stof die tot dusverre weinig werd onderzocht (o. a. de interessante onderzoekingen van MULDER verdienen hier vermelding) werd eveneens in 't waterig theeëxtract

terug gevonden. Weliswaar is dit extract steeds donkerbruin gekleurd en geeft het met loodoplossing ook een donkerbruin neerslag, terwijl de kleur van 't zuivere pectinezure lood wit is, maar wanneer men het waterig theeëxtract langen tijd kookt met beenderenkool, dan verkrijgt men in het lichtbruin gekleurde filtraat met lood een blijna kleurloos neerslag van het pectinezure lood, terwijl bij toevoeging van alkohol tot de gezuiverde oplossing het pectinezure kali zich evenals te voren als een geleiachtig zeer volumineus neerslag afscheidt. Even als het phosphorzuur is ook de kali uit de geëxtraheerde bladrest bijna geheel verdwenen (van de $2^1/_2$ pCt. in het theeblad werd er slechts 0,1 pCt. in de geëxtraheerde rest teruggevonden).

Van de anorganische bestanddeelen van het theeblad vonden wij volgens het voorgaande zoowel de *kali* als het *phosphorzuur* nagenoeg geheel terug of in het waterig extract (oxaalzure-, pectinezure- en phosphorzure kali) òf in het alkohol-extract (glycosied) doch hier eveneens in een in water oplosbaren vorm.

Het schijnt niet van belang ontbloot hier op dit feit te wijzen, aangezien het waarschijnlijk in verband moet gebracht worden met de omstandigheid dat juist deze beide anorganische bestanddeelen in tegenstelling met nagenoeg al de andere in hoeveelheid verminderen bij het ouder worden der blaren 1).

De *pentosanen* werden quantitatief bepaald volgens de gewone methode door distillatie met zoutzuur en bepaling van het overgegane furfurol niet phenylhydrazine.

Gevonden werd:

in fabrieksthee 3,1 pCt. en

in versch gedroogd blad eveneens 3,1 pCt. (de fabrieksthee was van dezelfde partij blad afkomstig).

Volgens dit voorloopig onderzoek verandert dus het pentosaangehalte niet merkbaar tijdens de fabrikatie, zoodat ook deze

---

1) Zie O.Keller in Landw. Vers. St. 33. en over een soortgelijk onderwerp de verhandeling van TUCKER en TOLLENS »Uber den gehalt der Platanenblätter an Nährstoffen und die Wanderung dieser Nährstoffe beim Wachsen und Absterben".

vrij indifferente stoffen wel geen belangrijke rol bij de fabrikatie zullen spelen.

Verder komen in het waterig extract nog kleine hoeveelheden andere verbindingen voor, waaronder plantenzouten (appelzure zouten reeds door anderen geconstateerd, citraten etc.) stikstofhoudende verbindingen als oplosbaar eiwit, amiden etc, waarover eene latere „Mededeeling" zal hebben te berichten.

XLVI

MEDEDEELINGEN UIT 'S LANDS PLANTENTUIN.

Van deze belangrijke serie verscheen o. m. het volgende:

No. 11,	No. 14, No. 16 en No. 17. Dr. S. H. KOORDERS en TH. VALETON, Bijdrage No. 1—4 tot de kennis der boomsoorten van Java . .	*f* 11.50
„ 12.	Dr. S. H. KOORDERS, Plantkundig woordenboek voor de boomen van Java. Met korte aanteekeningen over de bruikbaarheid van het hout. Bat. 1894	„ 2.—
„ 13.	Dr. W. G. BOORSMA, Eerste resultaten van het door hem verrichte onderzoek naar de plantenstoffen van Nederl. Indië. Bat. 1894. .	„ 1.50
„ 15.	Dr. J. VAN BREDA DE HAAN. De bibitziekte in de Deli-Tabak veroorzaakt door Phytophthora Nicotianae. Bat. 1896. Met plaat. .	
„ 18.	Dr. W. G BOORSMA, Nadere resultaten van het door hem verrichte onderzoek naar de planten van Nederl. Indië. Bat. 1897 . . .	„ 1.50
„ 19.	Dr. S. H. KOORDERS, Verslag eener botanische dienstreis door de Minahasa, tevens eerste overzicht der Flora van N. O. Celebes, uit een wetenschappelijk en praktisch oogpunt. Met 10 kaarten en 3 platen. Bat. 1898.	„ 15.—
„ 20.	Dr. J. C. KONINGSBERGER, De dierlijke vijanden der koffiecultuur op Java. Deel I. Bat. 1897. Met 6 platen	„ 2.50
„ 21.	Dr. A. v. BIJLERT, Onderzoek van eenige grondsoorten in Deli. Bat. 1897.	1.25
„ 22.	Dr. J. C. KONINGSBERGER, Eerste overzicht der schadelijke en nuttige insecten van Java. Bat. 1898.	„ 1.25
„ 23.	Dr. J. VAN BREDA DE HAAN, Regenval en reboisatie in Deli Bat. 1898	„ 2.—
„ 25.	M. GRESHOFF, Tweede verslag van het onderzoek naar de plantenstoffen van Nederlandsch-Indië. Bat. 1898.	„ 2.—
„ 26.	Dr. A. VAN BIJLERT, Onderzoek van eenige grondsoorten in Deli (Vervolg van No. 21). 1898	„ 2.50
„ 27.	Prof. DR. A. ZIMMERMANN, De Nematoden der koffiewortels . .	„ 2.—
„ 28.	Dr. J. M. JANSE, De nootmuscaat-cultuur in de Minahassa en op de Banda-eilanden. Met 4 platen.	„ 1.50
„ 29.	M. GRESHOFF. Tweede Gedeelte van de Beschrijving der Giftige en bedwelmende Planten bij de Vischvangst in gebruik, tevens overzicht der heroïsche gewassen der geheele aarde en hunner verspreiding in de natuurlijke planten familiën. [Monographia de plantis venenatis et sopientibus quae ad pisces capiendos adhiberi solent; Pars II.] Bat. 1900	„ 2.50
„ 30.	Dr. A VAN BIJLERT. Onderzoek van Deli-Tabak.	„ 2.—
„ 31.	DR. W. G. BOORSMA. Nadere Resultaten van het door hem verrichte onderzoek naar de plantenstoffen van Ned Indië (III). 1899.	„ 2.—
„ 32.	DR. J. G. KRAMERS. Verslag omtrent de proeftuinen en andere mededeelingen over koffie.	„ 2.75
„ 33.	Dr. S. H. KOORDERS en TH. VALETON, Bijdrage No. 5 tot de kennis der boomsoorten van Java. 1900.	„ 3.—
„ 34.	Dr. J. H. VERNHOUT. Onderzoek over bacteriën bij de fermentatie der Tabak.	„ 1.25
„ 35.	Dr. J. VAN BREDA DE HAAN, Levensgeschiedenis en Bestrijding van het Tabaks-aaltje (Heterodera radicicola) in Deli, met 3 platen.	„ 1.75
„ 36.	Dr. J. P. LOTSY. Physiologische proeven genomen met Cinchona succirubra 1e stuk	„ 0.75
„ 37.	Prof. Dr A. ZIMMERMANN. De Nemotaden der koffiewortels II, met 21 figuren in den text	„ 2.—
„ 38.	Dr. J. G. KRAMERS. Tweede verslag omtrent de proeftuinen en andere mededeelingen over koffie	„ 2.75
„ 39.	Dr. P. VAN ROMBURGH. Caoutchouc en Getah-pertja in Nederlandsch-Indië	„ 2.—
„ 40.	Dr. S. H. KOORDERS en TH. VALETON. Bijdrage No. 6 tot de kennis der boomsoorten van Java	„ 2.—
„ 41.	Dr. E. L. JULIUS MOHR. Over het drogen van de Tabak. . .	„ 1.25
„ 42.	Dr. S. H. KOORDERS en TH. VALETON. Bijdrage no. 7 tot de kennis der boomsoorten van Java	„ 2.75
„ 43.	Dr. A. VAN BIJLERT. Over Deligrond en Deli Tabak, naar aanleiding van de proefvelden aldaar. 1899	„ 2.25
„ 45.	H. C. H. DE BIE. De Landbouw der Inlandsche Bevolking op Java	„ 1.75

☞ Te bekomen voorzoover niet uitverkocht bij

Nos. 3, 4, 5, 24, zijn uitverkocht

G. KOLFF & Co.

BATAVIA en WELTEVREDEN.